

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*
Bertoni) FERTILIZADAS CON UN NOVEDOSO SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

PRESENTA

WILGINCE APOLLON

General Escobedo, N. L.

Enero de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*
Bertoni) FERTILIZADAS CON UN NOVEDOSO SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

PRESENTA

WILGINCE APOLLON

General Escobedo, N. L.

Enero de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*
Bertoni) FERTILIZADAS CON UN NOVEDOSO SISTEMA BIO-ELECTROQUÍMICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

PRESENTA

WILGINCE APOLLON

General Escobedo, N. L.

Enero de 2023

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
COMITÉ PARTICULAR

Ph. D. Alejandro Isabel Luna Maldonado
Director de tesis

Dr. Sathish-Kumar Kamaraj
Co-Director de tesis

Dr. Cs. Humberto Rodríguez Fuentes
Asesor

Ph. D. Juan Antonio Vidales Contreras
Asesor

Dr. Juan Florencio Gómez Leyva
Asesor

Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirectora de Estudios de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

Dedico primeramente mi trabajo de tesis a Dios, creador y sustentador de todas las cosas, por permitirme lograr esa gran meta que tanto he soñado. Luego, a toda mi familia y amigos que me han apoyado incondicionalmente durante todo el proceso. Un especial sentimiento de gratitud a mi amada madre Leona Apollon por sus consejos. Mis hermanas Matania, Mireille, Géraldine, Shelove, Pierreleine y Walena me han motivado y son muy especiales.

También dedico este trabajo a mi comité de tesis por ayudarme siempre a desarrollar mis habilidades Tecnológicas y profesionales durante todo el programa de doctorado.

Finalmente, dedico este trabajo de manera muy especial a mi querida esposa Yoldine Fayette y a mi hija Noah Gloria Apollon Fayette por ser mi mayor motivación. Sin sus presencias en mi vida, mi sueño no hubiese sido una realidad. Ambas han sido mi mayor fuerza de empuje para llegar a la meta.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van primeramente a CONACYT, por otorgarme la Beca de Doctorado. Luego, a la Subdirección de Posgrado e Investigación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por aceptarme en el Programa de Doctorado en Ciencias Agrícolas. También a mi Comité de Tesis por guiarme durante todo el transcurso del programa.

A mi familia, mi esposa Yoldine Fayette, Phabyson Fayette, Jusmathe Zamor, mis amigos, Shener Cean, Ananias Pierre, Jouvenson Jean, Jean Flaneche Jean Léger, Arile Ariste, Mario James Forest, Kenel Merzilus, Dieuner Valéus, Yves David, Wylorce Petit-Saint, Héctor Flores Breceda y aquellas personas especiales en mi vida que me han apoyado en las buenas y en las malas. No me podría sentirme más agradecido con la confianza puesta sobre mi persona. Este nuevo logro es en gran parte gracias a Ustedes.

Muchas gracias a aquellos seres queridos que siempre aguardo en mi alma.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Referencias	5
CAPÍTULO 1. AVANCES Y TENDENCIAS RECIENTES EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA ASISTIDAS POR FOTOSÍNTESIS.	7
1.1. Introducción.....	7
1.2. Diferentes configuraciones de los sistemas P-MFC	11
1.2.1. P-MFC tubular	12
1.2.2. P-MFC de placa plana.	13
1.2.3. Cátodo de Aire Flotante.	14
1.2.4. Planta flotante-MFC	16
1.2.5. Novedoso diseño de barra cerámica integrada verticalmente	17
1.3. Fotosíntesis asistida en sistemas MFC	¡Error! Marcador no definido.

1.3.1. Vías fotosintéticas.....	18
1.3.2. P-MFC apoyada por plantas CAM	¡Error! Marcador no definido.
1.3.3. Humedal construido-MFC (CW-MFC)	20
1.3.4. Macrófito basado en P-MFC.....	21
1.3.5. Briofita empleada en P-MFC	22
1.3.6. P-MFC a base de algas.....	23
1.4. Requerimientos para generar electricidad con P-MFC.....	27
1.4.1. Plantas / algas	27
1.4.2. Electroodos (ánodos y cátodos)	29
1.4.3. Membrana	30
1.4.4. Zona de la rizosfera de la comunidad bacteriana	31
1.4.5. Condiciones ambientales	35
1.4.6. Electricidad sostenible	36
1.4.7. Mediciones y cálculos de bioelectricidad.....	40
1.4.7.1. Voltaje de la celda	40
1.4.7.2. Curva de polarización.....	40
1.4.7.3. Salida de potencia, corriente y densidad de potencia	41
1.4.7.4. P-MFC en circuito cerrado	41
1.5. Factores que afectan el desempeño de las P-MFC	42
1.5.1. Desafíos	43
1.6. Aplicación en tiempo real de P-MFC: LED, sensores y transmisión de datos	43
1.7. Conclusiones.....	45
Referencias	47

CAPÍTULO 2. DESEMPEÑO DE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS DE MONITOREO DE ENERGÍA ELÉCTRICA PARA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA BASADA EN PLANTA	62
2.1. Introducción.....	62
2.2. Revisión de literatura.....	65
2.2.1. BES	65
2.2.2. Tipos de aceptores de electrones y materiales utilizados en P-MFC	67
2.3. Materiales y métodos	67
2.3.1. Construcción y operación del reactor P-MFC.....	67
2.3.2. Diseño e implementación del sistema de adquisición de datos.....	69
2.3.3. Mediciones de bioelectricidad.....	72
2.4. Resultados y discusión.....	73
2.4.1. Desempeño de los reactores en OCV.....	73
2.4.2. Experimento de polarización	75
2.5. Conclusiones.....	78
Referencias... ..	79
CAPÍTULO 3. REUTILIZACIÓN AUTOSOSTENIBLE DE NUTRIENTES ASOCIADA A LA GENERACIÓN DE ELECTRICIDAD A PARTIR DE NUEVAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA VEGETALES (P-MFC)	84
3.1. Introducción.....	84
3.2. Materiales y métodos	89
3.2.1. Ubicación del estudio	89
3.2.2. Recolección de muestras de orina	89
3.2.3. Operación e inoculación de los reactores P-MFC	89

3.2.4. Análisis químico de las orinas	91
3.2.5. Análisis químico del sustrato	91
3.2.6. Adquisición y cálculos de datos de bioelectricidad	92
3.2.7. Análisis estadístico	94
3.3. Resultados y discusión.....	94
3.3.1. Monitoreo de pH y CE en las muestras de orina	94
3.3.2. Cantidad de nutrientes	96
3.3.3. Parámetros fisicoquímicos del sustrato	102
3.4. Rendimiento de bioelectricidad	105
3.4.1. Circuito abierto	105
3.4.2. Experimentos de polarización	107
3.4.3. Circuito cerrado	114
3.5. Sostenibilidad energética	122
3.5.1. LCA de la P-MFC	124
3.6. Análisis económico-costos /beneficio de los materiales de configuración de las P-MFC.....	125
3.7. Conclusiones.....	128
Referencias.....	130
CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO DE STEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) MEDIANTE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO.....	138
4.1. Introducción.....	138
4.2. Materiales y métodos.....	141
4.2.1. Tratamientos evaluados.....	141
4.2.2. Etapas fisiológicas de la planta.....	143

4.2.2.1. Medición de los parámetros morfológicos de la planta... ..	143
4.2.3. Mediciones de bioelectricidad.....	144
4.2.4. Análisis de datos.....	145
4.3. Resultados y discusión.....	145
4.3.1. Monitoreo del crecimiento de las plantas.....	145
4.3.2. Operación a largo plazo en los reactores de P-MFC.....	151
4.3.3. Relación entre la generación de energía y el crecimiento de la planta..	158
4.4. Conclusiones.....	159
Referencias.....	161
CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CONSORCIO MICROBIANO	
ADHERIDO AL ÁNODO EN UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO.....	
5.1. Introducción.....	168
5.2. Materiales y métodos.....	170
5.2.1. Construcción y operación de las P-MFC.....	170
5.2.2. Mediciones de bioelectricidad.....	171
5.2.3. Extracción de ADN.....	172
5.2.4. Análisis estadístico.....	175
5.3. Resultados y discusión.....	175
5.3.1. Rendimiento de bioelectricidad.....	175
5.3.2. Análisis de la población bacteriana en la superficie del ánodo....	176
5.5. Conclusiones.....	179
Referencias.....	181
APÉNDICE.....	187

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1.1. Evaluación del desempeño de Algas-MFC para la producción de electricidad ...	26
1.2. Microorganismos encontrados en la zona de la rizosfera que producen electricidad y reportados en la literatura.....	33
1.3. Descripción general de las eficiencias reportadas en sistemas de P-MFC	38
3.1. Análisis químico inicial de las muestras de orina	100
3.2. Análisis químico final de las muestras tras la inoculación de los reactores.....	101
3.3. Composición química del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos.....	104
3.4. Rendimiento de polarización de los reactores P-MFC inoculados	113
3.5. Rendimiento promedio de generación de bioelectricidad en circuito cerrado...	114
3.6. Cálculos de IE considerando el peso de los materiales según GER.....	124
3.7. Material necesario para la construcción de las P-MFC y su estimaciónb de costos	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Esquema (adaptado de Helder <i>et al.</i> , 2012) de un sistema cilíndrico (a) y una placa plana (b) de una celda de combustible microbiana a base de plantas; lo cual dan = promedio de la distancia entre el ánodo y la membrana. Nota: en una placa plana, la distancia entre el ánodo y la membrana es más corta que en la cilíndrica.	14
1.2. Ilustraciones esquemáticas de (a) una celda de combustible microbiana de origen vegetal (P-MFC) con membrana y (b) P-MFC sin membrana, generando electricidad.....	15
1.3. Representación esquemática de un prototipo, usando una varilla de arcilla para producir electricidad con una planta de nopal.....	17
1.4. Esquema de un prototipo asistido por una planta de nopal, conduciendo una fuente de luz (alimentando un LED).....	20
1.5. Ilustración esquemática de otros diseños de P-MFC (adaptado de Kabutey <i>et al.</i> , 2019): (a) CW-MFC, (b) Macrófito-PMFC y (c) Briofita-MFC. Nota: C ₁ = cátodo 1, C ₂ = cátodo 2, C ₃ = cátodo 3; A ₁ = ánodo 1, A ₂ = ánodo 2 y A ₃ = ánodo 3.....	23
1.6. Representación esquemática de un prototipo utilizado en microalgas (p-MFC), lo cual tiene dos cámaras (ánodo y cátodo); donde las líneas discontinuas indican la posible integración de cámaras anódicas y catódicas con flujos de carbono.	25
1.7. Esquema del proceso de producción de bioelectricidad en P-MFC.....	27

1.8. Prototipo alimentando LED y reloj digital. De izquierda a derecha: conexión de 12 P-MFC, multímetro monitoreando el voltaje y la aplicación en tiempo real de los dispositivos.....	45
2.1. Representación esquemática de una MFC, generando electricidad mediante una resistencia (Ω) conectada a los electrodos anódico y catódico.....	66
2.2. (A) Membrana de maceta de arcilla, (B) electrodo construido e (C) ilustración esquemática de la P-MFC evaluada en este estudio... ..	68
2.3. Presentación esquemática general del sistema de adquisición de datos automáticos de voltaje de las P-MFC (adaptado de Maldonado-Ruelas et al., 2018).	70
2.4. Características del Arduino utilizado para el monitoreo de los datos de voltaje.	70
2.5. (a) Monitoreo de datos de voltaje mediante Arduino Mega 2560 y (b) una computadora personal registrando los datos.....	71
2.6. Esquema del Arduino UNO utilizado en este estudio.....	72
2.7. Rendimiento de salida de voltaje en los dos reactores durante 15 días... ..	75
2.8. (A) Curva de polarización y (B) curva de densidad de potencia de P-MFC y C-MFC en la etapa final del estudio.....	77
3.1. Croquis del experimento. Distancia entre UE: 0.70 m ² ; Área total: 19.6 m ²	90
3.2. El pH y la CE de la orina durante la primera etapa del experimento. EC (a) y pH (b) 72 horas antes de la inoculación; CE (c) y pH (d) 120 horas después de la inoculación.	96
3.3. Salida de voltaje durante el periodo de inicio de operación de las P-MFC. La flecha punteada de color rojo indica la estabilización del sistema y la de color negro representa la aplicación de los tratamientos con orinas del ganado.....	107

3.4. (a) Curvas de polarización y (b) curvas de densidades de potencia antes de aplicar los tratamientos con orinas.	108
3.5. (a) Curvas de polarización y (b) densidades de potencia 72 h después de aplicar los tratamientos con orinas.	110
3.6. (a) Curvas de polarización y (b) curvas de densidades de potencia 24 horas antes del funcionamiento de los P-MFC en circuito cerrado.....	113
3.7. Curvas de densidades de potencia y curvas de densidades de corrientes en los reactores (a) P-MFC-1* (control), (b) P-MFC-2, (c) P-MFC-3 y P-MFC-4 durante 43 días de operación con los tratamientos.....	118
3.8. Comportamiento de la densidad de potencia con la humedad del sustrato frente al tiempo en: (a) P-MFC-1* (sin tratamiento), (b) P-MFC-2 (con orina bovina), (c) P-MFC-3 (con orina de cabra, (d) P-MFC (con orina de oveja) en 43 días de operación. Nota: DP = Densidad de potencia y HS = Humedad del sustrato.	119
4.1. P-MFC instaladas y operadas durante el experimento... ..	142
4.2. Medición de (a) longitud de raíces y (b) conteo de número de raíces por planta.	144
4.3. Efecto de las P-MFC sobre los parámetros de crecimiento de <i>S. rebaudiana</i> : (a) altura de planta (cm); (b) número de brotes, y (c) diámetro del tallo (cm). Medias con la misma letra para cada figura son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$)..	150
4.4. Impacto de las P-MFC en la rizosfera de <i>S. rebaudiana</i> : (a) longitud de la raíz (cm), y (b) número de raíces. Medias con la misma letra para cada figura son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).....	151
4.5. Curvas de densidad de corriente y densidad de potencia en las (a) P-MFC-2, (b) P-MFC-1*, (c) P-MFC-3, (d) P-MFC-4 y (e) el testigo, durante 30 días. DC-Densidad de corriente; DP-Densidad de potencia.....	156

4.6. Valores de corriente obtenidos durante 30 días de monitoreo de los reactores (a) P-MFC-2, (b) P-MFC-1*, (c) P-MFC-3, (d) P-MFC-4 y (e) el testigo.....	157
4.7. Altura de planta vs generación de energía en las P-MFC evaluadas.....	159
5.1. Muestras de P-MFC.....	172
5.2. Bacterias encontradas en la superficie del ánodo de (a) P-MFC-1*, (b) P-MFC-2, (c) P-MFC-3 y (d) P-MFC-4. Medio de cultivo: agar nutritivo (AN).....	178
5.3. Bacterias (a) Gram positivas y (b) Gram Negativas encontradas en P-MFC-4. Medio de cultivo: ISP2.....	178
5.4. (a) extracción de ADN, (b) PCR y (c) Reamplificación de ADN de las bacterias encontradas en el ánodo de los reactores P-MFC.....	179

RESUMEN

Los sistemas bioelectroquímicos (BES, por sus siglas en inglés) como las celdas de combustible microbiana vegetal (P-MFC, por sus siglas en inglés) son tecnologías sostenibles y ecológicas, que utilizan exudados de raíces de plantas para nutrir directamente a las bacterias electroquímicamente activas (EAB, por sus siglas en inglés) para generar electricidad sostenible. Sin embargo, su uso en la evaluación del crecimiento de las plantas no ha sido suficientemente estudiado. Por lo anterior, este proyecto de investigación se dividió en cinco experimentos. En el primer experimento se mostraron los recientes avances en las configuraciones, los diferentes materiales de electrodos utilizados, los requisitos de producción de bioelectricidad para la mejora de las P-MFC, así como su posible aplicación en tiempo real y los desafíos asociados. En el segundo experimento se desarrolló un sistema automático de adquisición de datos de voltaje en tiempo real, el cual fue acoplado a un ATMEGA2560 conectado a una computadora personal. Se evaluó el rendimiento de generación de energía de dos tipos de reactores: Planta-MFC y control MFC (C-MFC) durante 15 días. El voltaje máximo alcanzado con la Planta-MFC fue de 850 mV, mientras que C-MFC alcanzó un voltaje máximo de 762 mV. Además, Planta-MFC logró una densidad potencia máxima de 66 mW m⁻² (polarización). En el tercer experimento estimó la reutilización directa de nutrientes asociados a la generación de bioelectricidad en PMFC embebida con *Stevia rebaudiana*. Las P-MFC fueron inoculadas con 642.865 mL de orina de tres especies de animales domésticos. Se logró una mayor reutilización directa de NH₄⁺-N

(94%), PO_4^{3-} (98%), y K (33%) en P-MFC inoculada con orina de bovino. La P-MFC inoculada con orina de cabra alcanzó una densidad de potencia máxima de $46.97 \pm 0.67 \text{ mW m}^{-2}$. En el cuarto experimento, se evaluó la interconexión entre el crecimiento de las plantas y la producción de bioelectricidad mediante el uso de P-MFC inoculadas con orina de animales domésticos. El mayor diámetro medio de tallo de $0.52 \pm 0,01 \text{ cm}$ se encontró en P-MFC-3, mientras que la P-MFC-2 alcanzó un mayor número medio de raíces [86 ± 2.50 (95% de mejora)] ($p < 0,05$). Además, P-MFC-4 presentó mayor altura de $50.08 \pm 0.67 \text{ cm}$. La P-MFC-2 indicó mayor densidad de potencia máxima de 43.68 mW m^{-2} (operación a largo plazo). En quinto experimento, se analizaron las bacterias electroquímicamente activas (EAB, por sus siglas en inglés) asociadas a la producción de bioelectricidad con P-MFC. Se realizó la extracción de ADN de cada cepa obtenida, y mediante PCR se confirmó la presencia de la bacteria. Mayor cantidad de bacterias en forma de *Bacilos* fue encontrada en el ánodo de P-MFC-4. Se considera que el rendimiento de una P-MFC depende de la actividad de las EAB adheridas en el ánodo. Los hallazgos del proyecto indicaron que Stevia P-MFC inoculada con orina es una buena opción para aumentar la cantidad de biomasa para las plantas agrícolas junto con la generación de energía. Además, este estudio abre el camino para mayor investigación de la evaluación del impacto de P-MFC en el crecimiento de las plantas.

SUMMARY

Bioelectrochemical systems (BES) such as plant microbial fuel cells (P-MFCs) are sustainable and eco-friendly technologies, which use plant root exudates to directly nourish the electrochemically active bacteria (EABs) to generate sustainable electricity. However, its use in evaluating plant growth has been insufficiently studied. Therefore, this research project was divided into five experiments. In the first experiment recent signs of progress in the configurations, different electrode materials used, the requirements of bioelectricity generation for the improvement of P-MFCs, as well as their possible application in real-time and associated challenges are shown. In the second experiment an automatic real-time voltage data acquisition system, which was coupled with an ATMEGA2560 connected to a personal computer was developed. The power generation performance of two types of reactors: Plant-MFC and control MFC (C-MFC), was evaluated for 15 days. The maximum voltage reached with Plant-MFC was 850 mV, whereas C-MFC achieved a maximum voltage of 762 mV. Furthermore, Plant-MFC achieved a maximum power generation of 66 mW m⁻² (polarization). In the third experiment, the direct reutilization of nutrients associated with the generation of bioelectricity in PMFC embedded with *Stevia rebaudiana* was estimated. The P-MFC were inoculated with 642.865 mL of urine from three domestic animals. Higher direct reutilization of NH₄⁺-N (94%), PO₄³⁻ (98%), and K (33%) was achieved in P-MFC inoculated with cow urine. PMFC inoculated with goat urine

reached a maximum power density of $46.97 \pm 0.67 \text{ mW m}^{-2}$. In the fourth experiment, interconnection between plant growth and the production of bioelectricity was evaluated by using P-MFCs inoculated with the urine of domestic animals. The greatest mean stem diameter of $0.52 \pm 0.01 \text{ cm}$ was found in P-MFC-3, while the P-MFC-2 with reached a higher average number of roots [86 ± 2.50 (95% improvement)] ($p < 0.05$). Besides, P-MFC-4 presented greater height of $50.08 \pm 0.67 \text{ cm}$. P-MFC-2 indicated a higher maximum power density of 43.68 mW m^{-2} (long-term operation). In the fifth experiment, the electrochemically active bacteria (EAB) associated with the production of bioelectricity with P-MFC were analyzed. DNA extraction was performed from each strain obtained, and the presence of the bacterium was confirmed by PCR. Greater number of bacteria in the form of *Bacillus* was found in the anode of P-MFC-4. The performance of a P-MFC is considered to depend on the activity of EABs attached to the anode. The study's findings indicated that Stevia P-MFC inoculated with urine was a good option to increase the biomass amount for the agricultural plants along with power generation. Further, this study opens the way for more investigation of evaluating the impact of P-MFC on plant growth.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La amenaza actual del cambio climático por la emisión de gases a efecto invernadero, la combustión de combustibles fósiles y el agotamiento de estos mismos, ha provocado un aumento en las alternativas para la producción de energía renovable y sostenible. Entre ellas se consideran a fuentes de energía confiable como: a) energía eólica, b) energía hidráulica, c) energía solar y d) bioenergía a partir de sistemas bioelectroquímicos [BES, por sus siglas en inglés] (Abolhosseini *et al.*, 2014; Apollon *et al.*, 2021).

Los BES tienen como objetivo principal convertir la energía química a energía eléctrica; en presencia de bacterias electroquímicamente activas (EAB, por sus siglas en inglés). La función principal de las EAB en un BES es usar los sustratos de azúcar produciendo dos compuestos químicos: (i) CO₂ y (ii) H₂O en condiciones aeróbicas. Las EAB que cumplen dicha función generando energía eléctrica se denominan exoelectrógenos; sin embargo, para que sea útil la corriente producida por estos microorganismos, es necesario usar una celda de combustible [FC, por sus siglas en inglés] (Logan y Regan, 2006).

La celda de combustible microbiana (MFC, por sus siglas en inglés) es un dispositivo creado (derivado de BES) para generar bioelectricidad. Este sistema ha sido objeto de

numerosas investigaciones durante las dos últimas décadas (Liu y Logan, 2004; Logan, 2010; Logan *et al.*, 2015). Sin embargo, la utilización de MFC presenta problema en la generación continua de energía, por la proliferación de biomasa en el cátodo (Logan, 2010); también se registra una reducción de materia orgánica en el substrato (Strik *et al.* 2008a). Cid *et al.* (2018) probaron la eficiencia de un sistema de MFC para el pretratamiento de orina humana por microorganismos presentes en el ánodo y generar energía eléctrica. Se logró una densidad de potencia máxima (23 mW m^{-2}) en un periodo de 120 días, tiempo de operación de la MFC. Teóricamente es la eficiencia más conocida de los principales pasos del proceso.

Para resolver los problemas de eficiencia de producción de bioelectricidad usando MFC, se buscaron otras estrategias de producción de energía, como la utilización de rizodepósitos (a partir de las plantas). Por esta razón, se desarrolló por primera vez en 2008 la celda de combustible microbiana vegetal (P-MFC, por sus siglas en inglés), con el objetivo principal de generar bioelectricidad constantemente (Strik *et al.*, 2008b). La implementación de la P-MFC da la posibilidad de generar electricidad mientras la planta crece simultáneamente. La producción simultánea de electricidad y biomasa permite producir bioelectricidad que es amigable al medioambiente. En una P-MFC, las EAB catalizan la oxidación anaeróbica de los exudados (rizodepósitos) liberados por las raíces de la planta, luego genera bioenergía (Helder *et al.*, 2012a). Los exudados liberados a través de las raíces son convertidos en tres elementos: electrones, protones y dióxido de carbono (CO_2) por la actividad de las EAB presentes en la rizosfera de la planta. De acuerdo con Strik *et al.* (2008a), la mayor producción de bioenergía de una P-MFC depende de tres factores claves: a) tasa fotosintética, b)

cantidad de exudados liberados por las raíces de la planta y, c) la forma de recuperación de energía en la P-MFC. En 2017, una densidad de potencia máxima de 222 mW m^{-2} (eficiencia de conversión de 0.022 %) fue lograda, utilizando abono y una membrana de arcilla como material de electrodo (Sophia y Sreeja, 2017). Este rendimiento fue más alto que lo encontrado por Strik *et al.* (2008b) (67 mW m^{-2}) utilizando *Glyceria máxima*.

La tecnología P-MFC ha sido probada también para evaluar el crecimiento de las plantas (Helder *et al.*, 2012a). El uso de este tipo de sistema bioelectroquímico hace que la planta tenga mejor contenido de biomasa. Apollon *et al.* (2020) usaron una novedosa P-MFC para evaluar el comportamiento morfológico de cuatro especies de *Opuntia* (*O. joconostle*, *O. robusta*, *O. albicarpa* y *O. ficus-indica*) en un ambiente semiárido durante cinco meses; y encontraron que el uso de la P-MFC mejoró el crecimiento de las especies de *Opuntia*. Las especies *O. albicarpa* y *O. ficus-indica* alcanzaron mayor altura (cm) en comparación con el testigo (planta sin el sistema instalado).

Por otra parte, la orina del ganado es una fuente de fertilización sostenible y confiable en la agricultura, debido a su alto contenido de urea, además de otros elementos esenciales que la planta requiere para su crecimiento. Se reportaron varias técnicas de recuperación de nutrientes y de energía en la orina (Ledezma *et al.*, 2015). Hoy en día la orina del ganado se convierte en una fuente muy importante del ciclo de N en sistemas agrícolas. Según Whitehead *et al.* (1986), con la presencia del ganado la cantidad de N devuelta en el suelo en forma de urea es alrededor de $125\text{-}250 \text{ kg ha}^{-1}$. Se reportó que en la orina de ovejas la proporción de urea es de un 25 %, y un 90 %

en la orina de bovino pastizado con mucha hierba fertilizada. Por último, la aplicación de orina del ganado al igual que la orina humana en el sistema P-MFC podría ser no solo una fuente sostenible de nutriente para las plantas, sino también una fuente importante de electrolitos para el electrodo catódico.

El propósito de este estudio fue desarrollar un novedoso sistema bioelectroquímico para suplir nutrientes a las plantas de *Stevia*, aumentando su rendimiento en cuanto a la generación de bioelectricidad y también evaluar la comunidad microbiana electrogénica presente en la rizosfera de la planta. La implementación del BES tiene efecto sobre el crecimiento de *Stevia rebaudiana*, por lo tanto, mediante la aplicación de dosis de orina de bovino, ovino y caprino aumenta su rendimiento y también el potencial adecuado para generar bioelectricidad. Esta tesis se divide en cinco capítulos:

Capítulo 1: Avances y tendencias recientes en las celdas de combustible microbianas asistidas por fotosíntesis.

Capítulo 2: Desempeño de un sistema de adquisición de datos de monitoreo de energía eléctrica para una celda de combustible microbiana basada en planta.

Capítulo 3: Recuperación autosostenible de nutrientes de la orina con celdas de combustible microbianas basadas en planta.

Capítulo 4: Evaluación del comportamiento morfológico de *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a través de un sistema bioelectroquímico.

Capítulo 5: Caracterización molecular del consorcio microbiano adherido al ánodo en un sistema bioelectroquímico.

Referencias

- Abolhosseini, S., Heshmati, A. & Altmann, J. (2014). A Review of Renewable Energy Supply and Energy Efficiency Technologies. IZA Discussion Papers 8145, Institute of Labor Economics (IZA). Consultado el 10 de marzo de 2022: <http://ftp.iza.org/dp8145.pdf>
- Apollon, W., Sathish-Kumar, K., Silos-Espino, H., Perales-Segovia, C., Valera-Montero, L. L.... & Gómez-Leyva, J. F. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: demonstration of their applications. *Appl. Energy*, 279(23), 115788.
- Apollon, W., Luna-Maldonado, A. I., Kamaraj, S. K., Vidales-Contreras, J. A., Rodríguez-Fuentes, H., Gómez-Leyva, J. F., & Aranda-Ruíz, J. (2021). Progress and recent trends in photosynthetic assisted microbial fuel cells: A review. *Biomass Bioenergy*, 148, 106028.
- Cid, C. A., Stinchcombe, A., Ieropoulos, I. & Hoffmann, M. R. (2018). Urine microbial fuel cells in a semi-controlled environment for onsite urine pre-treatment and electricity production. *J. Power Sources* 400, 441–448.
- Helder, M., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Kuijken, R.C.P. & Buisman, C.J.N. (2012a). New plantgrowth medium for increased power output of the Plant-Microbial Fuel Cell. *Bioresour Technol*, 104, 417–423.
- Ledezma, P., Kuntke, P., Buisman, C. J. N., Keller, J., & Freguia, S. (2015). Source-separated urine opens golden opportunities for microbial electrochemical technologies. *Trends Biotechnol*, 33(4), 214–220.
- Liu, H. & Logan, B.E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004), pp. 4040–4046
- Logan, B.E. & Regan, J.M. (2006). Electricity producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol*, 14, 512–518.

- Logan, B.E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1665–1671.
- Logan, B.E., Wallack, M.J., Kim, K.-Y., He, W., Feng, Y. & Saikaly, P.E. (2015). Assessment of microbial fuel cell configurations and power densities. *Environ. Sci. Technol. Lett.* [10.1021/acs.estlett.5b00180](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00180)
- Sophia, A. C., & Sreeja, S. (2017). Green energy generation from plant microbial fuel cells (PMFC) using compost and a novel clay separator. *Sustain Energy Technol and Assess*, 21, 59–66.
- Strik, D. P. B. T. B., Snel, J. F. H. & Buisman, C. J. N. (2008b). Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870–876.
- Strik, D. P. B. T. B., Terlouw, H., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2008a). Renewable sustainable biocatalyzed electricity production in a photosynthetic algal microbial fuel cell (PAMFC). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 659–668.
- Whitehead, D. C., Van der Meer, H.G, Ryden, J. C. & Ennik, G. C. (1986). Sources and transformations of organic nitrogen in intensively managed grassland soils. In: *Nitrogen Fluxes in Intensive Grassland Systems*, eds, Nijhoff, Dordrecht, pp 47–58.

CAPÍTULO 1. AVANCES Y TENDENCIAS RECIENTES EN LAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS ASISTIDAS POR FOTOSÍNTESIS

1.1. Introducción

Las MFC son BES que se han desarrollado para producir electricidad sostenible. Las MFC generan energía eléctrica a través de las actividades metabólicas de las EAB (Domínguez-Garay y Esteve-Núñez, 2018). Esta tecnología no es nueva y el concepto de utilizar bacterias como catalizadores en las celdas de combustible se investigó ya en la década de los 70s (Suzuki, 1976). Además, la idea de generar electricidad utilizando cultivos microbianos fue informada a principios del siglo XX (Potter, 1911). Según Lovely (2006), las tecnologías MFC representan un enfoque novedoso del uso de bacterias para la producción de bioelectricidad por oxidación de residuos orgánicos y biomasa renovable. Habermann y Pommer (1991) diseñaron la primera MFC para el tratamiento de aguas residuales. Luego, en 2004, otros tipos de MFC fueron desarrollados para el mejoramiento de la generación de energía (Liu y Logran, 2004), lo que brinda posibles oportunidades para aplicaciones prácticas de esta tecnología en la vida real.

Los primeros prototipos de BES desarrollados fueron las MFC. En una MFC, las reacciones biológicas se utilizan para la reacción de oxidación de la biomasa, y se dividen en dos según el tipo de catalizador utilizado: 1.-enzimas y 2.-microorganismos. Cuando se usan enzimas, el mecanismo más ampliamente estudiado es el sistema de oxidación de dos electrones por glucosa oxidasa (GOx) o glucosa deshidrogenasa (GDH) (Azuma y Ojima, 2018). Las MFC tienen funciones importantes tales como: (i) conversión de material orgánico en sistemas de generación de energía con el beneficio adicional del tratamiento de residuos (Ali *et al.*, 2020) y (ii) recuperación química de productos básicos (Naina Mohamed *et al.*, 2020).

Las celdas de combustible microbiana basadas en plantas (P-MFC) son una tecnología emergente que potencialmente puede producir energía de manera sostenible. Las P-MFC, son BES capaces de convertir la energía almacenada en cualquier sustrato biodegradable de manera directa en electricidad (Strik *et al.*, 2008). Esta tecnología, se basa en dos procesos probados, rizodeposición (compuestos orgánicos o exudados liberados por la planta) y producción de electricidad por las EAB, existentes en la superficie del electrodo (De Schamphelaire *et al.* 2010, Timmers *et al.*, 2013, Tapia *et al.*, 2017), por lo cual también es capaz de mejorar la eficiencia de generación de energía eléctrica (Helder *et al.*, 2013). Durante este proceso, los electrones que se transfieren al electrodo del ánodo se consumen en el compartimiento del cátodo por reducción típica de oxígeno al agua (Strik *et al.*, 2011). La P-MFC tiene el objetivo principal de que la planta a través del proceso fotosintético almacene la energía en forma química, luego a través de este sistema se transforma a energía eléctrica. En la Ecuación 1.1 se observa la reacción química (fotosíntesis) en una P-MFC:



En comparación a otras MFC, las P-MFC pueden producir electricidad continua sin competir por alimentos y esta tecnología puede ser operada en cualquier lugar. Las leves condiciones de funcionamiento hacen que las P-MFC reciban más atención que las otras fuentes de energía tradicionales. Sin embargo, se requieren más investigaciones para enfrentar los desafíos de esta tecnología antes de su aplicación comercial.

El contenido de humedad en el suelo de la P-MFC ha sido reportado como uno de los factores que influyen en la generación de electricidad (Moqsud *et al.*, 2015a) y eso permite el transporte de electrones al cátodo del electrodo (Chiranjeevi *et al.*, 2012). La relación entre la humedad del suelo y la producción de electricidad es proporcional. De hecho, en estudios previos realizados con P-MFC, se han apreciado disminución considerable de energía eléctrica después de cesar el riego (Li *et al.*, 2016). Las P-MFC han sido probadas en plantas C₃ y C₄ adaptadas a condiciones de saturación del agua en el suelo. Sin embargo, en plantas CAM (plantas suculentas) esta tecnología ha sido muy poco estudiada.

En la última década se llevaron a cabo intensivas investigaciones sobre los posibles usos de las P-MFC para el tratamiento de ecosistemas contaminados y también la producción de bioenergía, por lo tanto, hubo intereses particulares sobre las posibles aplicaciones de esta tecnología (Kabutey *et al.*, 2019), por lo cual, se han publicado determinados artículos de revisión sobre varios aspectos de las P-MFC. El primer sistema de P-MFC fue desarrollado en el año 2008 (Strik *et al.*, 2008). Posteriormente,

en 2011, se descubrieron los principios y el rendimiento de las P-MFC incluyendo celdas solares microbianas (MSC), así como también las perspectivas y desafíos para futuras aplicaciones de estos sistemas (Strik *et al.*, 2011). Más tarde, Moqsud *et al.* (2015a) investigaron los factores que afectan la operación de las P-MFC. Luego, Nitisoravut y Regmi (2017) realizaron aportaciones para el progreso de las P-MFC, así como determinaron los factores que afectan el rendimiento de este sistema, las perspectivas, y desafíos. Por otro lado, Regmi *et al.* (2018) describieron el desarrollo histórico del sistema P-MFC y los parámetros operativos tales como: la selección de plantas, suelo, pH, humedad, salud microbiana y conductividad. Recientemente, Kabutey *et al.* (2019) proporcionaron ideas sobre las configuraciones y aplicaciones de las P-MFC. No obstante, todavía no se había abordado el uso de plantas semidesérticas en P-MFC como fuentes sostenibles de energía. Estos artículos de revisión no buscaban abordar las aplicaciones de las plantas vivas para mejorar la generación de energía en PMFC, incluidos los requisitos para la producción de bioelectricidad y sus aplicaciones prácticas en tiempo real.

El objetivo de este capítulo es (a) proporcionar información reciente sobre los aspectos importantes de P-MFC en términos de configuración, *v. gr.* tipos de sistemas P-MFC desarrollados y los diferentes tipos de materiales utilizados para mejorar la generación de bioelectricidad, (b) fotosintético asistido en sistemas MFC; mediante el uso de plantas semidesérticas (plantas CAM), plantas C₃ y C₄, macrófitas, briofitas y algas, (c) evaluar el comportamiento de la densidad de potencia de P-MFC operado en diferentes condiciones de agua, (iv) los requisitos para generar bioelectricidad y (d) mediciones y cálculos de bioelectricidad. Finalmente, se presentaron los factores que

afectan el funcionamiento de los P-MFC, así como los desafíos y la aplicación en tiempo real de los PMFC: LED, sensores y transmisión de datos. Debido a este documento de revisión, se generaron nuevas ideas en términos de los aspectos destacados de los BES (es decir, P-MFC), que ahora deben investigarse para su desarrollo para su aplicación de manera sostenible, económica y a gran escala.

1.2. Diferentes configuraciones de los sistemas P-MFC

En la generación de electricidad por sistemas biológicos, hay que considerar la configuración del sistema que será utilizado, dado que es el aspecto más importante para considerar en el diseño de una P-MFC. Esta tecnología depende en gran medida de la calidad de los materiales utilizados para construir el P-MFC, *v. gr.* los tipos de materiales anódicos y catódicos. En la actualidad, existen diferentes tipos de diseños de P-MFC, todos los cuales han sido desarrollados para obtener un mejor rendimiento de generación de bioelectricidad. Dos de los tipos notificados de diseños de P-MFC fueron: cámara simple y doble (Deng *et al.*, 2012). La P-MFC de cámara única tiene un solo compartimento de ánodo sin separador (membrana) y sin compartimento de cátodo. Mientras que el P-MFC de doble cámara contiene dos compartimentos (anódicos y catódicos) separados por una membrana para facilitar la transferencia a través del cátodo, evitando la difusión de catolito y O_2 al ánodo (Min y Logan, 2004). Más recientemente, se han desarrollado y aplicado con éxito otros modelos P-MFC. A continuación, se discuten los tipos de reactores (P-MFC) más usados, y también las configuraciones más comunes en la actualidad.

1.2.1. P-MFC tubular

Primeramente, existe un sistema de P-MFC cilíndrico (tubular) (Figura 1.1a), el cual fue configurado para analizar tres especies de plantas: *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* y *Arundo donax* con el fin de detectar el rendimiento de biomasa y la producción de electricidad, así como también incrementar la producción de energía eléctrica (Helder *et al.*, 2010). En esta investigación se usó como ánodo un cilindro de plexiglás con una longitud de 9.9 cm y una membrana de intercambio catiónico de tipo (Fumatech, Frankfurt, Alemania) que estaba pegado al fondo. La membrana se utilizó para separar el ánodo del cátodo para que no hubiera contacto entre ambos. Posteriormente, se llenó el cilindro con gránulos de grafito de un espesor menor de 1 mm. En los gránulos de grafito se colocaron las plantas. Por otro lado, se colocó el ánodo en el compartimiento del cátodo de 12 cm de longitud, fabricado con fieltro de grafito y colocado en la parte inferior de un vaso de precipitado.

Para la generación de electricidad con el cultivo de arroz, un sistema tubular de celdas de combustible microbiana basada en planta (planta tubular-MFC) fue diseñado por Sudirjo *et al.* (2019a) con las mismas características del sistema utilizado por Wetser *et al.* (2017); el cual fue diseñado anteriormente para aumentar la viabilidad de esta tecnología (Timmers *et al.*, 2013). Los electrodos del ánodo y del cátodo fueron hechos del mismo material (fieltro de carbono, KFA-5 mm de espesor, SGL Carbon GmbH, Bonn, Alemania). Posteriormente, con un novedoso sistema bioelectroquímico (vaso de arcilla-MFC) con superficie modificada, se generó electricidad a partir de efluente de nopal biogás (Kamaraj *et al.*, 2019). Tanto la cámara del ánodo como la del cátodo fueron hechas por fieltro de grafito (Fuel cell store, U.S.A.).

1.2.2. P-MFC de placa plana

Por otra parte, Helder *et al.* (2012a) probaron otros tipos de P-MFC que consistían en una placa plana (Figura 1.1b), las cuales fueron operadas durante un periodo de 370 días (cámara microclimática para el cultivo de plantas, modelo 1750, marca Snijders) a una temperatura de 20 °C y una humedad relativa de 75 % con un régimen luz-oscuridad de 14:10 horas y una intensidad de luz de $596 \pm 161 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medida en la parte superior de las P-MFC por un medidor de intensidad de luz (Photodyne 44XLA). La cámara anódica constaba de fieltro de grafito (Grado WDF, 6 mm, Productos de Especialidad Nacional), fieltro de carbono y grafito (Taiwán, 5 cm de altura superior, medio e inferior) (Helder *et al.*, 2013; Helder *et al.*, 2012b). En la fabricación de la P-MFC también se utilizaron anillos de plástico para la separación física y electrónica de los ánodos. Para la operación del sistema, se utilizaron tres plantas de *Spartina anglica* por cada P-MFC. Posteriormente, las plantas se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas de manera continua hasta alcanzar su desarrollo fisiológico. Para incrementar la conductividad eléctrica se añadieron 10 gL^{-1} de NaCl a cuatro medios de crecimiento de plantas. Los medios de crecimientos fueron: 1.-medio sin sulfato, rico en bicarbonato de amonio; 2.-medio sin nitrato, cloruro de amonio; 3.- medio Hoagland modificado al 50 % por Timmers *et al.* (2010); 4.-medio sin nitrato, rico en bicarbonato de amonio. Estos medios de crecimiento de las plantas fueron lavados de manera continua con nitrógeno para eliminar oxígeno presente en la reacción. En otro experimento, las P-MFC de placas planas estuvieron en operación durante 703 días (Helder *et al.*, 2012b).

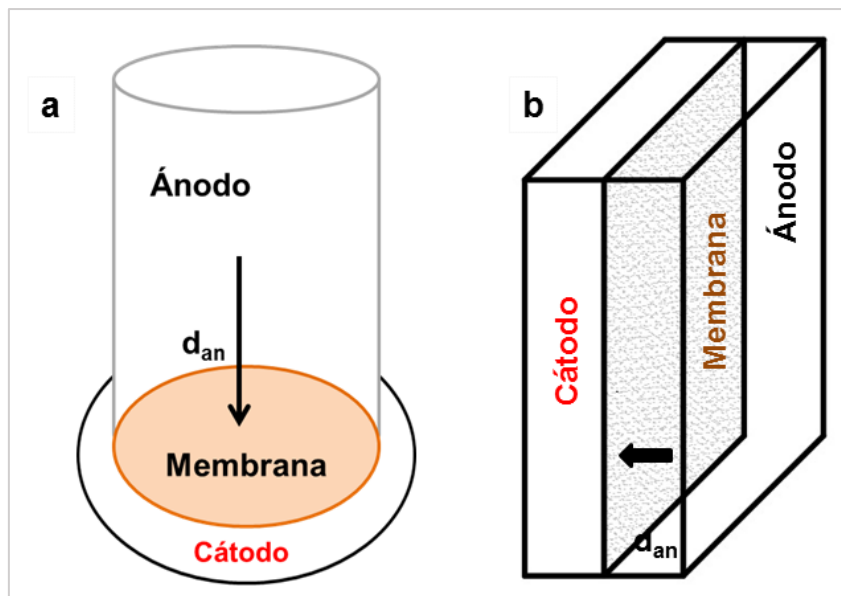


Figura 1.1. Esquema (adaptado de Helder et al., 2012) de un sistema cilíndrico (a) y una placa plana (b) de una celda de combustible microbiana a base de plantas; lo cual d_{an} = promedio de la distancia entre el ánodo y la membrana. Nota: en una placa plana, la distancia entre el ánodo y la membrana es más corta que en la cilíndrica.

1.2.3. Cátodo de Aire Flotante

El cátodo se define como el electrodo del que sale una corriente convencional a partir de un dispositivo eléctrico polarizado. Una corriente convencional describe la dirección en la que se mueven las cargas positivas. Pues, los electrones son de cargas negativas, por lo que se mueven de manera opuesta al flujo de corriente convencional. En sistema bioelectroquímico, como la MFC, el cátodo juega un rol crucial en la generación de energía sostenible. El buen funcionamiento de la MFC depende mucho del material catódico (Ezziat *et al.*, 2019) que se usa, así como también la colocación del mismo. Adicionalmente, la fabricación de materiales del cátodo es el aspecto más

importante para que la tecnología MFC se aplique con éxito (Rahimnejad *et al.*, 2015). El cátodo puede ser clasificado en abiótico y biótico (Modestra *et al.*, 2016). Por lo tanto, en la cámara catódica, ocurre una reacción de reducción, donde los electrones, protones y oxígeno reaccionan para formar agua (Regmi *et al.*, 2018). En 2015, se usó un cátodo colocado en la parte superior del suelo para determinar los factores que influyen en la generación de bioelectricidad usando plantas de arroz (Moqsud *et al.*, 2015a). Las Figuras 1.2a y 1.2b representan el uso de un cátodo tanto utilizado en la capa superior del suelo, así como en enterado en el mismo para generar electricidad. Posteriormente, en un campo de arroz existente en Kalimantan Occidental, Indonesia, se usó un cátodo colocado en la parte superior del suelo para evaluar el rendimiento de un sistema de adquisición de datos de larga distancia, usando una P-MFC tubular (Sudirjo *et al.*, 2019a).

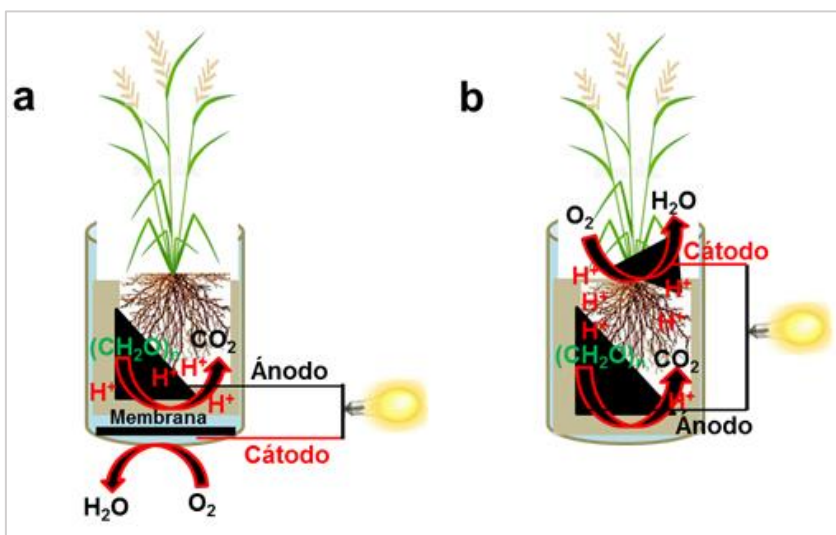


Figura 1.2. Ilustraciones esquemáticas de (a) una celda de combustible microbiana de origen vegetal (P-MFC) con membrana y (b) P-MFC sin membrana, generando electricidad.

1.2.4. Planta flotante-MFC

La tecnología de celdas de combustible microbianas flotantes (f-MFC) es otra alternativa sustentable, conveniente para la recuperación de energía en cuerpos de agua tales como: mar, lagunas, ríos, etc. (Schievano *et al.*, 2017). La f-MFC está hecha por una estructura flotante, que incluye dos cámaras anódica y catódica generalmente separadas por una capa eléctricamente aislante. El cátodo se puede exponer tanto al agua dulce, así como también al aire; por lo tanto, el ánodo debe estar incrustado en un sistema semicerrado, donde la exposición al aire y las condiciones estancadas se quedan mantenidas fácilmente. Una f-MFC ha sido desarrollada por Martinucci *et al.*, (2015), la cual funcionó durante mucho tiempo en una piscina de aguas residuales. El sistema constaba de un ánodo hecho por una placa plana y un cátodo en tela de carbono, ambos separados por un fieltro de polipropileno. Se logró una densidad de potencia máxima de 14 mW m^{-2} en el cátodo. Recientemente, otro diseño de f-MFC (híbrido de un sedimento-MFC y una P-MFC) fue configurado por Schievano *et al.*, lo cual, se colocaba en una caja de marco flotante apto para ser un Jardín flotante (Schievano *et al.*, 2017). La f-MFC tenía las siguientes características: (i) el cátodo hecho en tela de carbono libre de catalizadores químicos (SAATI, SCCT-8, Legnano, Italia) colocado externamente en la parte inferior de la caja (directamente expuesta al agua); (ii) al igual que el cátodo, el ánodo está fabricado de tela de carbono plana enterrado en la parte inferior de la caja (cubierta por una capa de arcilla de 1 cm). El rendimiento del sistema fue monitoreado periódicamente durante aproximadamente 180 días. Se registró una densidad de potencia máxima de $22\text{-}28 \text{ mW m}^{-2}$ (cátodo) después de 20-30 días de la puesta en marcha del sistema.

1.2.5. Novedoso diseño de barra de cerámica integrada verticalmente

Apollon *et al.* (2020) construyeron una celda de combustible microbiana, usando una barra de cerámica (longitud: 32 cm) integrada de verticalmente para la generación de bioelectricidad con plantas de nopal (Figura 1.3). El material del electrodo catódico fue lámina de zinc (Zn), colocado en la parte superior del suelo (cátodo de aire flotante). Por otra parte, el material del electrodo anódico fue fieltro de grafito 100 mm de largo y de 6 mm de espesor, colocado a una profundidad de aproximadamente 15 cm en el suelo. Este novedoso sistema de arcilla enchufable integrado verticalmente fue el más adecuado para mejorar la eficiencia energética usando nopal (planta semidesértica) en comparación con otro sistema reportado en otros lugares que usa plantas suculentas (Tapia *et al.*, 2017).

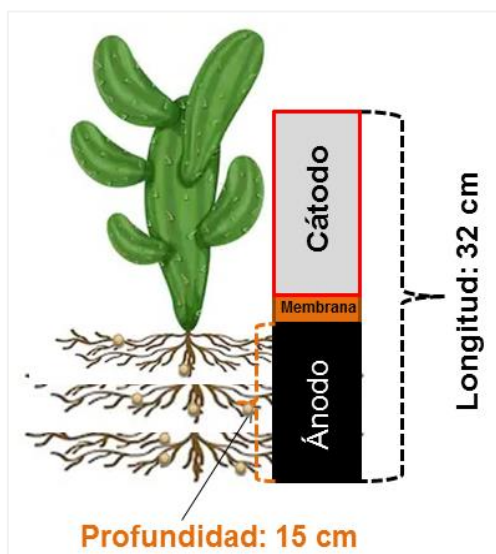


Figura 1.3. Representación esquemática de un prototipo, usando una varilla de arcilla para producir electricidad con una planta de nopal.

1.3. Fotosíntesis asistida en sistemas MFC.

1.3.1. Vías fotosintéticas

La rizodeposición y la vía fotosintética (Helder *et al.*, 2010) son posiblemente los efectos cruciales para la generación de electricidad con las P-MFC. Por eso, la elección de plantas apropiadas permite maximizar la potencia de salida en los sistemas de P-MFC. De este modo, las plantas se clasifican en tres clases: C₃, C₄ y CAM, donde en cada clase las plantas difieren entre sí con respecto a sus rutas fotosintéticas. Según Wang *et al.* (2012), las plantas C₄ presentan tasa fotosintética más eficaz y alta que la de las demás clases de plantas. Se ha comprobado que este tipo de planta (C₄), cuando se emplea en una P-MFC, tiene el mayor potencial para convertir la energía química en bioelectricidad. Hasta el momento, se han comprobado con P-MFC las siguientes clases de plantas en condiciones de saturación: *Spartina anglica* (C₄) (Wester *et al.*, 2017; Helder *et al.*, 2012); *Oryza sativa* (C₃) (Ueoka *et al.*, 2016); *Glyceria maxima* (C₃) (Timmers *et al.*, 2013). Estas plantas fueron las pioneras utilizadas en P-MFC. Por otro lado, la especie de planta *A. donax* exhibe una mayor eficiencia que las especies de C₄ (Helder *et al.*, 2010). Para elegir plantas en un sistema P-MFC, es preciso tomar en cuenta las rutas fotosintéticas de las mismas, es decir, si son de tipo C₃, C₄ o CAM. Las vías metabólicas juegan un papel muy importante en la conversión de energía con P-MFC.

1.3.2. P-MFC apoyada por plantas CAM

Tapia *et al.* (2017) construyeron ocho reactores, utilizando siete especies de *Sedum* (*S. album*, *S. hybridum*, *S. kamtschaticum*, *S. reflexum*, *S. rupestre*, *S. sexangulare* y *S. spurium*) para evaluar el potencial de adaptación de estas especies en condiciones no saturadas de agua. De los ocho reactores, siete contenían una planta individual y una MFC que no contenía ninguna planta fue utilizada como control. Se usaron macetas de plástico de 450 mL para la operación de los sistemas. La configuración del cátodo se realizó usando fieltro de grafito de 92 mm de diámetro y 6 mm de espesor (MudWatt, EE. UU.), los cuales fueron enterrados a una profundidad de 7 cm; luego se colocó el ánodo en la superficie del sustrato. Después de 120 días de operación de los reactores, se cambiaron los electrodos de fieltro de fibra de grafito superior (ánodos) por gránulos de carbón activado (3 mm en diámetro; 35 cm³ de volumen) y también una barra de grafito (como conexión), para un mejor funcionamiento del electrodo en el sustrato durante los períodos sin aplicación de riego. Se usaron alambres de titanio de 23 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro para cerrar los circuitos con una resistencia externa de 1 k Ω . Los reactores fueron operados bajo condiciones controladas durante 360 días. La temperatura ambiental promedio fue de 20 \pm 2 °C y un periodo de luz prolongado de 14 h por día, con promedio de radiación solar de 23 \pm 2 W/m².

Posteriormente, se utilizaron cuatro especies de *Opuntia* (*O. ficus-indica*, *O. joconostle*, *O. robusta* y *O. albicarpa*) para la producción de bioelectricidad en ambiente semiárido (Apollon *et al.*, 2020). Se construyeron 16 reactores (P-MFC) con

plantas y cuatro sin plantas (control). Las plantas fueron trasplantadas en macetas con capacidad de 4.5 kg. Se colocaron las P-MFC en las macetas a 15 cm de profundidad, cerca de las raíces de las plantas y sin perjudicarlas (Figura 1.4). El sistema fue operado durante un largo periodo (30 días). Se reportó alto rendimiento de densidad de potencia de 103.6 mW m^{-3} (por volumen de producción) en la especie *O. albicarpa* durante el estudio. Por otra parte, se logró una producción de energía de 3.66 Wh m^{-2} en este estudio. Estos resultados muestran que este tipo de tecnología podría ser implementada en áreas áridas y semiáridas.

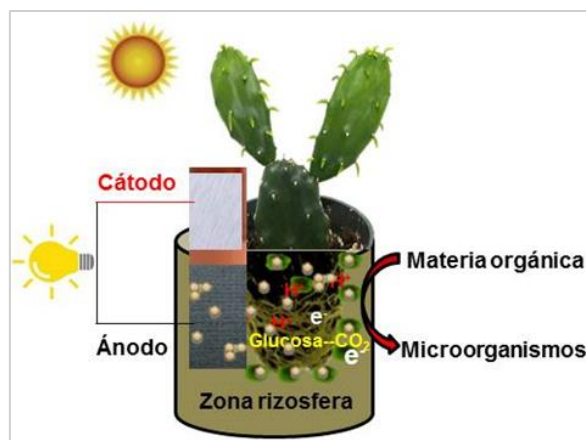


Figura 1.4. Esquema de un prototipo asistido por una planta de nopal, conduciendo una fuente de luz (alimentando un LED).

1.3.3. Humedal construido-MFC (CW-MFC)

El CW-MFC es un sistema mediante el cual se controla la contaminación del agua (Figura 1.5a) (Doherty *et al.*, 2015). Este sistema comprende dos procesos probados, de los cuales (i) recibe las aguas residuales y (ii) descarga el efluente con apoyo de las plantas que actúan como aireación (Xu, *et al.*, 2016). Un CW-MFC consta de dos

compartimentos, uno anódico (cámara anódica) y el otro anódico (cámara catódica) ambos separados por membranas de intercambio de protones (Santoro *et al.*, 2017); además de materiales fibrosos o tierras. Las reacciones bioquímicas se producen en el compartimento anódico, donde los microbios electroactivos se desarrollan sobre el material anódico, tomando los exudados liberados por la raíz a través de la rizodeposición de las plantas acuáticas para fabricar electrones y protones (Singh *et al.*, 2018). La fijación de raíces de las plantas en el compartimento catódico excreta oxígeno (O₂) mediante la rizosfera; permitiendo mejorar el rendimiento de la CW-MFC (Dong *et al.*, 2011). El primer sistema de la CW-MFC fue reportado por Yadav en el año 2010 (Yadav, 2010). Recientemente, las densidades de potencia máximas reportadas en CW-MFC fueron $184.75 \pm 7.50 \text{ mWm}^{-3}$ (Oon *et al.*, 2017), $719.57 \pm 67.67 \text{ mWm}^{-3}$ (Araneda *et al.*, 2018), y 25.78 mWm^{-3} (Wang *et al.*, 2020), respectivamente. El uso de las CW-MFC permite tratar las aguas residuales y generar de manera simultánea bioelectricidad (Guadarrama-Pérez *et al.*, 2019).

1.3.4. Macrófito basado en P-MFC

Según Pieterse y Murphy (1990), los macrófitos son plantas acuáticas multicelulares que crecen sumergidas o flotantes a través de la superficie del agua del mar o en ecosistemas fluviales. De esa forma, el macrófito-MFC (Figura 1.5b) es un sistema de ingeniería ecológica mediante el cual los macrófitos se emplean como biota (Kabutey *et al.*, 2019). Estas plantas fabrican sus alimentos a partir de los procesos fotosintéticos, donde, los rizodepósitos y los exudados liberados se utilizan como

materia orgánica (MO) suplementario en la CW-MFC para la generación de electricidad (Liu *et al.*, 2013). Estas especies de plantas tienen efectos cruciales en las eficiencias de eliminación de contaminantes como N, P y metales pesados, así como también las comunidades de microorganismos (Vymazal, 2011). Mohan *et al.* (2010) utilizaron macrófitos sumergidos y emergentes con filtro alimentadores para el tratamiento de aguas residuales domésticas (DS) y también aguas residuales de destilería fermentada (FDW) de un biorreactor productor de hidrógeno; donde el sistema podría eliminar de manera significativa la Demanda Química de Oxígeno (DQO), el nitrato (NO_3) y la turbidez. Posteriormente, Chiranjeevi *et al.* (2013) utilizaron otro tipo de sistema basado en macrófito emergente y sumergido (SEMS) con SMFC para producir bioelectricidad con aguas residuales. Las plantas acuáticas y algas demostraron ser eficientes en el tratamiento tanto de las aguas residuales, como también de las aguas residuales de destilería fermentada.

1.3.5. Briofita empleada en P-MFC

Piyare *et al.* (2017) reportaron las briofitas como plantas sin tejidos vasculares, las cuales son más tolerantes a la deshidratación que las demás plantas (Bombelli *et al.*, 2016). Esta característica fisiológica les permite almacenar agua y nutrientes para sobrevivir en condiciones adversas (en una amplia gama de temperaturas y hábitats). Estas plantas no tienen raíces, sin embargo, poseen rizoides vellosos, los cuales los unen a la superficie sobre la cual crecen. Se reproducen por esporas. Fueron los primeros vegetales que, en el Paleozoico, aseguraron el paso a la vida terrestre. El

primer sistema de MFC basado en briofita (bryo-MFC) fue reportado por Hubenov y Mitov (2011), utilizando el bosque musgo *Dicranum montanum* (Figura 1.5c). La potencia de salida máxima de 6.7 mWm^{-2} fue reportada por Bombelli *et al.* (2016), utilizando *Physcomitrella patens* (un musgo planta) para generar bioelectricidad.

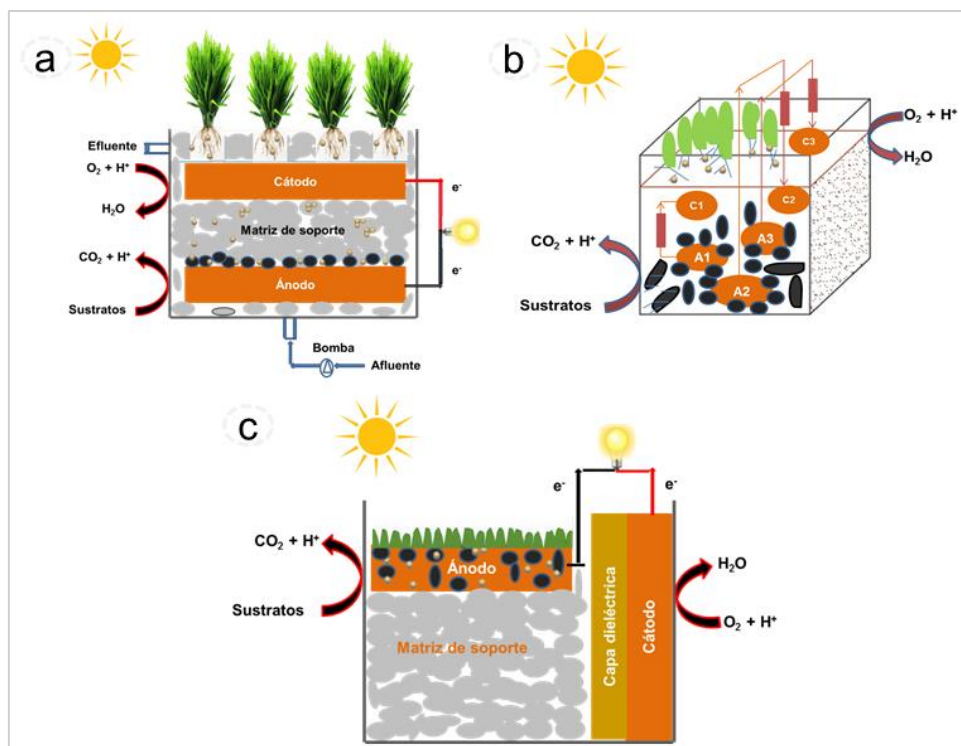


Figura 1.5. Ilustración esquemática de otros diseños de P-MFC (adaptado de Kabutey *et al.*, 2019): (a) CW-MFC, (b) Macrófito-PMFC y (c) Briofita-MFC. **Nota:** C₁= cátodo 1, C₂= cátodo 2, C₃= cátodo 3; A₁= ánodo 1, A₂= ánodo 2 y A₃= ánodo 3.

1.3.6. P-MFC a base de algas

Las algas son de origen natural, pueden ser espontáneos y no controlados ni limitados. Durante la puesta en marcha de la MFC, los diferentes cationes de los protones se

mueven del ánodo hasta el cátodo mediante una membrana de intercambio de protones (PEM, por sus siglas en inglés) (Rozendal *et al.*, 2006), que es un mecanismo a través del cual pueden soportar los requerimientos de micronutrientes de algas para sostener y mejorar el crecimiento de las algas (Gajda *et al.*, 2015).

Recientemente, se desarrolló una P-MFC empleando algas como elemento de biorreconocimiento en sensores fotosintéticos (Chouler *et al.*, 2019). Las algas en una P-MFC actúan como donantes de electrones (Figura 1.6) o como aceptor de electrones; y éstas se pueden utilizar tanto en la cámara anódica como en la cámara catódica para cumplir dicha función. En el compartimento anódico asistido por algas, la presencia de un contaminante interfiere con los electrones que se generan, para provocar así un cambio en la corriente de base (González Olias *et al.*, 2019). Se ha detectado la herbicida $C_8H_{14}ClN_5$ (atrazina) (Chouler *et al.*, 2019), así como también otros tipos de contaminantes como Zn, Cu y Ta (Labro *et al.*, 2017) y últimamente formaldehído (Chouler *et al.*, 2019), han sido comprobados. Los cátodos de algas (Cuadro 1.1) funcionan para eliminar la necesidad de suministrar el aire mecánico en el cátodo, por lo que se reduce costes de funcionamiento y reducción de las emisiones globales de CO_2 de respiración bacteriana anódica (Gajda *et al.*, 2015).

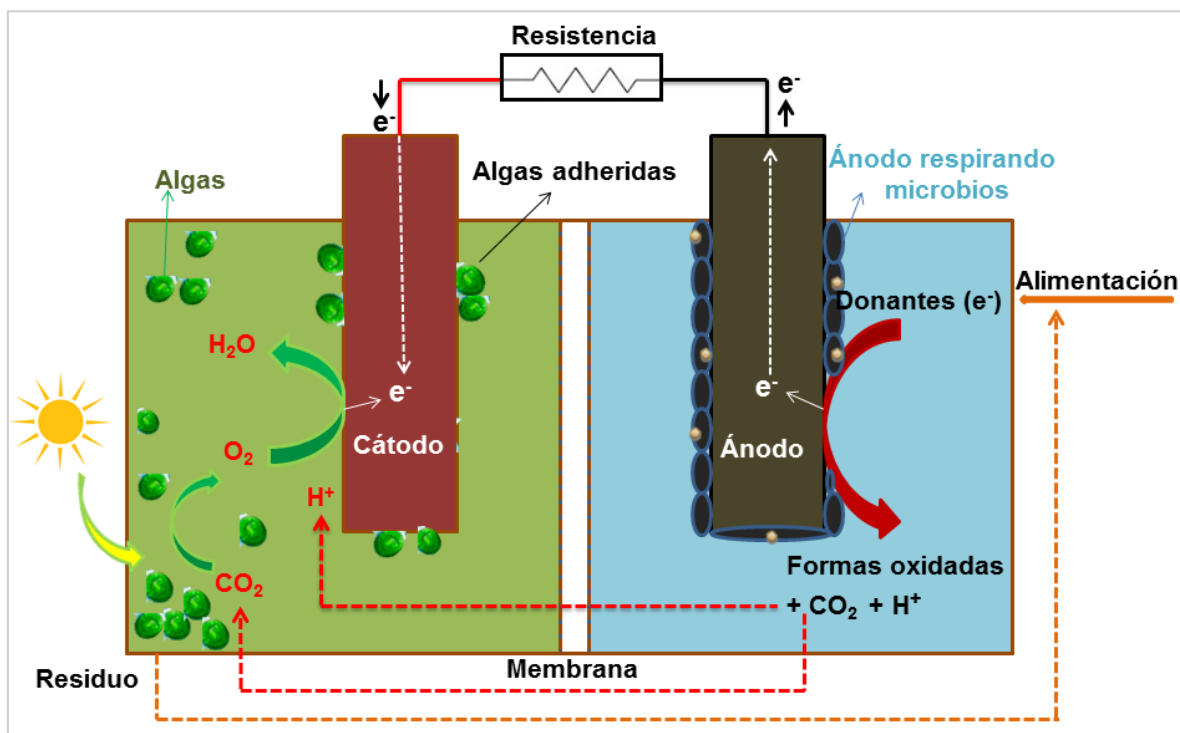


Figura 1.6. Representación esquemática de un prototipo utilizado en microalgas (p-MFC), lo cual tiene dos cámaras (ánodo y cátodo); donde las líneas discontinuas indican la posible integración de cámaras anódicas y catódicas con flujos de carbono.

Cuadro 1.1. Evaluación del desempeño de Algas-MFC para la producción de electricidad.

Cepas de algas (en el cátodo)	Tipo de MFC	Materiales de cátodo	Potencia densidad máxima	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doble cámara	Hoja de cobre	19151 mW m ⁻³	Hou <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella sp.</i>	Doble cámara	Tela de fibra de carbono (75 cm ²)	0.14 mW m ⁻²	Hu <i>et al.</i> (2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doble cámara	Hoja de cobre	400 mW m ⁻³	Hou <i>et al.</i> (2017)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doble cámara	Platino (0.5 mg cm ²)	62.7 mW m ⁻²	Gouveia <i>et al.</i> (2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doble cámara	N/A	34.2 mW m ⁻²	Commault <i>et al.</i> (2017)
<i>Spirulina</i>	Cámaras simples y dobles	Tala de carbon	(0.8-1 W m ⁻²)	Colombo <i>et al.</i> (2017)
<i>Golenkinia sp.</i>	Doble cámara	Placa de graffito	327.67 mW m ⁻²	Huarachi-Olivera <i>et al.</i> (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doble cámara	Malla de acero inoxidable	126 mW m ⁻³	Bazdar <i>et al.</i> (2018)
<i>Chlorella sp.</i>	Doble cámara	Espuma de Ni/electrode de grafeno	36.6 mW m ⁻²	Zhang <i>et al.</i> (2018)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Doble cámara	Tela de carbono/Pt y CB	~400 mW m ⁻³	Angioni <i>et al.</i> (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	DMFC	Fieltro de graffito	2.7 W m ⁻³	Khandelwal <i>et al.</i> (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	DMFC	Tela de fibra de carbono	3720 mW m ⁻³	Zhang <i>et al.</i> (2019)
<i>Mixed algal culture</i>	DMFC	Tela de fibra de carbono	50 mW m ⁻²	Nguyen <i>et al.</i> (2017)
<i>Mixed algal culture</i>	DMFC	Tela de fibra de carbono	0.15 mW m ⁻²	Kakarla y Min (2019)

Note: DMFC-Celda de combustible microbiana de doble cámara; Pt-Platino; CB-Carbón negro y Ni-Níquel.

1. 4. Requerimientos para generar electricidad con P-MFC

Para la generación de electricidad con plantas, se deben considerar varios aspectos. A continuación, se describen cada una de las etapas que se deben tomar en cuenta para producir energía eléctrica a partir de plantas capaces de adaptarse a cualquier condición ambiental (Figura 1.7).

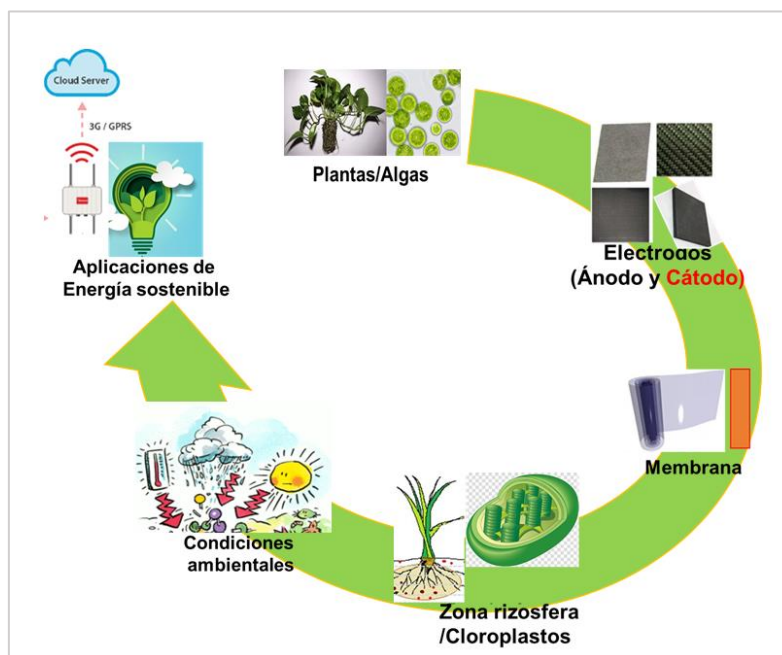


Figura 1.7. Esquema del proceso de producción de bioelectricidad en P-MFC.

1.4.1 Plantas /algas

La selección de plantas con vías fotosintéticas eficientes es crucial para una rizodeposición sustancial, así como también, generar potencia máxima en la P-MFC. El dióxido de carbono de los ciclos vegetales C_4 se convierte en un compuesto de

azúcar de cuatro carbonos y entra en el ciclo de Calvin. Las plantas que crecen en climas cálidos y secos exhiben la máxima eficiencia fotosintética, la cual, conduce a la formación de una mayor rizodeposición que se descompone por los microorganismos para generar energía (Deng *et al.*, 2012). Otros tipos de plantas, como los pastos y las monocotiledóneas, consisten en adventicios sistemas de raíces con mayor superficie de rizosfera para la proliferación de microbiomas (Wang *et al.*, 2012). Las plantas pueden desarrollarse (con sus raíces) en condiciones de anegamiento, para evitar la entrada de oxígeno del aire al ánodo (Strik *et al.*, 2011); por lo tanto, la elección de especies de plantas ayuda a incrementar la producción de energía en una P-MFC (Strik *et al.*, 2008). Así pues, con la presencia de oxígeno en el ánodo, los electrones se utilizan directamente para reducir el oxígeno y estos se pierden durante la generación de electricidad. La fotosíntesis es crucial (fundamental) en la producción de biomasa a partir de la luz solar, lo que le permite aumentar la producción de electricidad. Por otro lado, las algas han sido identificadas como un excelente recurso para la producción de biocombustibles y bioquímicos (Show *et al.*, 2015). Previamente, se utilizó la biomasa de algas para la producción de aceite, y resultó ser más rentable por unidad de área de cultivo en comparación a la biomasa de cultivos como la soja y el maíz. El uso de algas en la producción de biodiesel ha captado mucho la atención de investigadores debido a su gran potencial para la aplicación práctica (Lee *et al.*, 2015).

1.4.2. Electrodo (ánodo y cátodo)

La construcción de una P-MFC, requiere materiales de electrodos muy eficientes con el objetivo de aumentar la producción de electricidad; así como también, la eficiencia coulombica con disminución de costos durante la ampliación (Chiranjeevi *et al.*, 2019). Se han utilizado diferentes tipos de materiales de electrodos como fibra de carbono, tela de carbono, fieltro de grafito, placas /varillas /discos de grafito, malla de acero inoxidable y gránulos de grafito, para una transferencia efectiva de electrones con la ayuda de las bacterias de la rizosfera al electrodo en la P-MFC. Cuando se utilizan materiales de electrodo similares tanto para cátodo como ánodo en P-MFC, se observan un incremento en la potencia de salida y también en la eficiencia de transferencia de electrones. Se ha reportado que el grafito el fieltro es un material de electrodo eficiente tanto para ánodo y como para el cátodo en P-MFC.

En una P-MFC, se utilizan dos compartimentos (cámaras) de electrodos. Estos son el compartimiento anódico y el catódico. El compartimiento anódico es el electrodo al que migran los iones o aniones negativos de la celda. Los iones negativos pierden electrones aquí y se produce la oxidación. Por tanto, el ánodo se define como el electrodo donde los electrones o la corriente salen de la celda. Mientras, la cámara catódica es el electrodo al que migran los cationes o iones positivos en solución. Aquí, adquieren electrones y se reducen. Así pues, el cátodo se puede definir como el electrodo donde los electrones o la corriente ingresan a la celda. Se ha reportado la región del cátodo llamado biocatodo (Rothballer *et al.*, 2015), que asiste a la producción de electricidad. Un biocatodo es un electrodo de material barato (*p. ej.*, carbono), con la facultad de contener una gran población microbiana en la superficie

del electrodo, o sea, en el electrolito que cataliza la reacción catódica. Para que actúe como un biocátodo en un BES, los microbios presentes deben ser capaces de tomar electrones del material electrodo, usando estos electrones para producir hidrogeno (Croese *et al.*, 2011).

1.4.3. Membrana

El uso de una membrana (separador) permite separar las reacciones producidas por los electrodos anódicos y los catódicos (véase Figura 1.2a en la sección 1.2.3), también evitar el transporte de oxígeno a la cámara del ánodo (Scott, 2016a). La membrana es el componente esencial en una celda de combustible microbiana. Ésta, ayuda a incrementar la producción de electricidad. Su naturaleza y sus propiedades son factores importantes que contribuyen en el aumento de la resistencia interna de la MFC, causando la disminución del rendimiento de estas y también limitando su aplicación práctica (Scott, 2016b); sin embargo, a pesar de su rápido desarrollo durante las últimas décadas, está limitada para transferir protones, así como también por la fuga de oxígeno (Li *et al.*, 2011). Por otro lado, la membrana permite reducir el flujo de cualquier sustrato no deseado de las cámaras anódica y catódica, y oxígeno del cátodo a, por lo cual se mejora la eficiencia Coulómbica (Liu y Lorgan, 2004). Se ha reportado en un estudio que una MFC que no tiene membrana, puede llegar a producir más energía que una MFC con membrana unida al cátodo (Liu y Lorgan, 2004); esto significa que la membrana afecta de manera negativa la producción de energía.

Muchos estudios han sido desarrollados sobre la selección de materiales ideales como separador (membrana) en celdas de combustibles (FC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, la elección de una membrana ideal para la FC comparte ciertos criterios que incluyen (a) resistencia interna, (b) estabilidades mecánicas, químicas y térmicas, (c) conductividad iónica, (d) permeabilidad, (e) bioincrustaciones y (f) costo, etc., necesarios para el funcionamiento eficiente de la FC (Dharmalingam *et al.*, 2019). Se han utilizados varios tipos de membrana en MFC hasta la fecha. Nafion, es un tipo de membrana popular utilizada en MFC debido a su excelente conductividad iónica (Rozendal *et al.*, 2009). Adicionalmente, para sustituir la membrana de Nafion, se han introducido membranas comerciales tales como membrana bipolar (BPM, por sus siglas en inglés) (Heijne *et al.*, 2006), membrana de intercambio aniónico (AEM, por sus siglas en inglés), membrana de intercambio catiónico (CEM, por sus siglas en inglés) (Lefebvre *et al.*, 2011), membranas nanoporosas (Ghasemi *et al.*, 2013) y membrana de microfiltración (Tang *et al.*, 2010). Sin embargo, varias membranas alternativas han estado estudiando e informando para superar los desafíos tanto económicos como medioambientales (Dharmalingam *et al.*, 2019); tales como, membrana de cerámica (Sondhi *et al.*, 2003), vaso de arcilla (cantarito) (Kamaraj *et al.*, 2019) y palo de cerámica (Apollon *et al.*, 2020).

1.4.4. Zona de la rizosfera de la comunidad bacteriana

La mayor concentración de población bacteriana encontrada en el suelo se asocia con las raíces de las plantas, donde sus números pueden alcanzar hasta 10^9 a 10^{12} por gramo de suelo, que conducen a una biomasa equivalente a 500 kg/ha^{-1} (Narasimhan

et al., 2003). En esta zona, existe una relación de simbiosis entre las EAB con las plantas que liberan exudados (compuestos). Estos exudados ricos en compuestos carbonatados sirven de alimento a las bacterias que, a cambio proporcionan minerales que necesitan las plantas. Las EAB forman biopelículas en la superficie del electrodo, donde liberan protones en el cátodo. Las bacterias se consideran organismos más numerosos en el suelo, 10^7 a 10^8 por gramo de suelo. Pues, 4600 genomas diferentes de procariontes fueron detectados estudiando la diversidad filogenética y la heterogeneidad del ADN en un gramo de suelo (De Schamphelaire *et al.*, 2010). La rizosfera es considerada como el sitio ideal para modificar poblaciones de microbios para diversas aplicaciones en el suelo (O'Connell *et al.*, 1996).

Los ánodos de las P-MFC presentan una gran diversidad de géneros bacterianos que dependen exclusivamente de la naturaleza del inóculo, del combustible y también del tipo de P-MFC utilizada (Logan *et al.*, 2006; Esteve-Núñez, 2008). A través de la gran revolución en el campo de MFC, se han descubierto microorganismos electrogénicos que tienen capacidad de transferir los electrones al ánodo sin presencia de mediadores redox artificiales (Lovely, 2006). En el Cuadro 1.2 se presentan las bacterias con probada actividad electrogénica. Sin embargo, no existe información sobre la forma en que transfieren los electrones al electrodo. Por otra parte, las bacterias que transfieren electrones de manera directa al ánodo son aquellas bacterias pertenecientes al género *Geobacter*, siendo dominantes dentro de las comunidades microbianas electrogénicas (Esteve-Núñez, 2008); *Geobacteraceae* son los anaerobios obligados asociados con la generación de energía en las celdas de combustibles microbianas basadas en sedimentos (S-MFC) (Lowy *et al.*, 2006).

Cuadro 1.2. Microorganismos encontrados en la zona de la rizosfera que producen electricidad y reportados en la literatura.

Microorganismos	Electrodos		Plantas	Referencias
	Ánodo (%)	Cátodo (%)		
<i>Nitrospira sp.</i>	100		<i>Oryza sativa</i>	De Schampelaire <i>et al.</i> (2010)
<i>G. hydrogenophilus</i>	87		"	"
<i>G. metallireducens</i>	96		"	"
<i>Desulfobulbaceae</i>	92		"	"
<i>Proteobacteria</i>	94		"	"
<i>N. acetinitrilica</i>	96	96	"	Kaku <i>et al.</i> (2008)
<i>R. bacterium</i>	96	96	"	"
<i>R. gluconicum</i>	99	99	"	"
<i>Betaproteobacteria</i>	10.5		"	Sudirjo <i>et al.</i> (2019a)
<i>Deltaproteobacteria</i>	1.7		"	"
<i>Pseudomonadaceae</i>	8		"	Kamaraj <i>et al.</i> (2020)
<i>Xanthomonadaceae</i>	7.42		"	"
<i>Geobacteraceae</i>	5.45		<i>Oryza sativa</i>	"
Archaea	0.39-1.93		<i>S. anglica</i>	Sudirjo <i>et al.</i> (2019b)
<i>G. proteobacteria</i>	20.2-50.2		"	"
<i>D. proteobacteria</i>	26.2-44.5		"	"
<i>B. proteobacteria</i>	3.4-27.8		"	"
<i>A. proteobacteria</i>	11.7-21.6		"	"
<i>E. proteobacteria</i>	2.2-11.6		<i>S. anglica</i>	"
<i>Proteobacteria</i>	67.1	59.9	<i>Sedum species</i>	Tapia <i>et al.</i> (2017)
<i>Actinobacteria</i>	38.98	15.38	"	"
<i>Methanobacterium</i>	95	-	<i>G. maxima</i>	Timmers <i>et al.</i> (2012)

*Todas son bacterias Gram-negativas reportadas en P-MFC.

Moulin *et al.* (2001) afirmaron que hay una sola relación entre la rizosfera de las plantas (la zona de las raíces) y los microorganismos. Esta relación se debe a la disponibilidad de exudados liberados por las raíces de la planta a los microbios y en este el papel de los microbios es mejorar la absorción de nutriente para las plantas. Según Timmers *et al.* (2012), la comprensión de la comunidad bacteriana ayuda a entender la competencia que existe entre los diferentes donantes de electrones en las P-MFC. Los microbios productores de hidrogeno se encuentran en muchos entornos (Schwartz y Friedrich, 2006), además de contener enzimas (hidrogenasas) catalizadoras que participan en la siguiente reacción reversible: $2H + 2e^- \leftrightarrow H_2$. En estudios anteriores, se han utilizados con éxito las hidrogenasas purificadas en electrodos hechos con carbono como catalizador para producir hidrógeno (Lojou, 2011; Vincent *et al.*, 2007; Lojou y Bianco, 2004).

Bacilio-Jiménez *et al.* (2003) reportaron la potencia de salida en un sistema bioelectroquímico empleando plantas (P-MFC) como una función de la cantidad de exudados liberados de la raíz, así como también la morfología de la raíz (Chiranjeevi *et al.*, 2012), además de la eficiencia fotosintética (Takanezawa *et al.*, 2010) y también la relación que existe entre planta-microorganismo (Kaku *et al.*, 2008). Por lo tanto, se puede obtener una mejor potencia de salida en una P-MFC seleccionando plantas adecuadas, las cuales liberan compuestos orgánicos (rizodepósitos) en condiciones óptimas. El uso de los rizodepósitos máximos para generar electricidad es muy importante para el buen funcionamiento del sistema de manera sostenible y por largo periodo (Strik *et al.*, 2008). El Cuadro 1.3 representa la actuación de las P-MFC reportadas en estudios previos. Se utilizaron especies de plantas (C₃ y C₄) capaces de

adaptarse en condiciones de saturación de agua en el suelo para generar electricidad de manera continua. Sin embargo, se ha comprobado que las plantas suculentas (CAM), como el género *Sedum*, podría ser también una opción viable para generar electricidad en zonas semiáridas.

1.4.5. Condiciones ambientales

Los factores fisicoquímicos tales como: la temperatura, la humedad, el pH, la conductividad y la intensidad de luz, afectan el rendimiento de las P-MFC. También, las plantas, las algas y las bacterias (Regmi *et al.*, 2018), son factores biológicos que influyen en el rendimiento de los sistemas de P-MFC. Desde la implementación de las P-MFC, estas han sido investigadas en distintas condiciones ambientales, *p. ej.*, en el laboratorio (Gonzalez Olias *et al.*, 2019) usando algas para detectar una herbicida (atrazina) en el agua, en invernadero (Helder *et al.*, 2010), para la producción de concurrente de bioelectricidad y biomasa en tres especies de plantas (*S. anglica*, *A. anomala* y *A. donax*) y también en campos abiertos tal como el campo arrozal (Sudirjo *et al.*, 2019).

Li *et al.* (2013) demostraron que la temperatura ambiente tiene un efecto sobre el rendimiento del MFC. Cuando la temperatura subió a 37 °C, se alcanzó una densidad de potencia volumétrica máxima de 7,89 W m⁻³, lo que significa que cuando se bajó a 10 °C aumentó en un 199 % (2.64 W m⁻³). Se ha demostrado que la temperatura y la radiación solar son los principales factores ambientales que influyen en la generación de bioelectricidad en P-MFC incrustado con el cultivo de arroz (Moqsud *et al.*, 2015).

La tecnología de P-MFC se ha utilizado mucho en condiciones de inundación, así como también en ecosistema de semidesierto (Tapia *et al.*, 2017). El Cuadro 3 representa el desempeño de las P-MFC operadas en diferentes condiciones ambientales. La posibilidad de utilizar la irradiación de luz para potenciar la producción de electricidad en la P-MFC ha recibido mayor atención en la última década, con el desarrollo de diferentes sistemas y conceptos capaces de convertir la luz en bioelectricidad (Gouveia *et al.*, 2014).

1.4.6. Electricidad sostenible

A nivel del mundo, la producción de electricidad genera aproximadamente 26 % de emisiones de gases de efecto invernadero. Es una de las principales causas del cambio climático. Esta situación permite a tomar medidas drásticas para implementar un sistema eléctrico basado en fuentes de energía renovable, *v. gr.*, energía eólica, solar e hidroeléctrica, etc.; sin embargo, en comparación con las fuentes de electricidad tradicionales, la producción de energía de más fuentes renovables es hasta ahora variable y poco confiable en algunos casos (IRENA, 2018), y las baterías convencionales tienen una respuesta acelerada de unos pocos milisegundos (Luo *et al.*, 2015).

La producción de electricidad mediante tecnología eólica ha aumentado de 4.8 MW en 1995 a más de 239 GW en 2011. En el futuro, la capacidad mundial aumentará a casi 1.100 GW en 2035, de los cuales el 80 % procederá de turbinas eólicas en tierra (Shahrouz *et al.*, 2014). Además, la energía solar (de paneles solares) es una fuente renovable, que podría reemplazar a los combustibles fósiles altamente contaminantes.

La producción de electricidad de esta fuente de energía depende en gran medida de las condiciones climáticas. Por tanto, es evidente que una fluctuación en el clima podría afectar la generación de energía solar (Ngô y Natowitz, 2009), teniendo en cuenta también los problemas de polvo en la utilización de paneles solares (Sarver *et al.*, 2013). La energía hidroeléctrica sigue siendo la mayor fuente de energía renovable para la producción de electricidad en todo el mundo. Aun así, el desarrollo de esta fuente de energía es difícil debido a su elevado coste y también a las preocupaciones medioambientales (Shahrouz *et al.*, 2014).

Con base en los hechos anteriores, se puede argumentar que la sustentabilidad es la satisfacción de nuestras propias necesidades sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para realizar también sus propias actividades. La sostenibilidad comprende tres pilares: (a) medio ambiente, (b) sociedad y (c) economía. Por último, la energía sostenible es la única fuente de energía respetuosa con el medio ambiente, que debe ser investigada a fondo para dar respuesta a la demanda de electricidad y teniendo en cuenta las múltiples y complejas variables.

Cuadro 1.3. Descripción general de las eficiencias reportadas en sistemas de P-MFC.

Especies de plantas	Tipos de plantas	Condición de operación	Tipos de electrodos	Densidad de potencia máxima	Referencias
<i>O. sativa</i>	C3	Ambiente	Filtro de grafito	33 mW m ⁻²	De Schampelaire <i>et al.</i> (2010)
<i>O. sativa</i>	C3	Campo de arroz	Filtro de grafito	6 mW m ⁻²	Kaku <i>et al.</i> (2008)
<i>A. anomala</i>	C4	Cámara climática	Filtro de grafito	22 mW m ⁻²	Helder <i>et al.</i> (2010)
<i>A. calamus</i>	C4	Cámara climática	Filtro de grafito	22 mW m ⁻²	Yan <i>et al.</i> (2015)
<i>C. indica</i>	C4	Humedal construido	Disco de grafito	18 mW m ⁻²	Lu <i>et al.</i> (2015)
<i>C. involucratus</i>	C3	Ambiente	Filtro de grafito	5.9 mW m ⁻²	Nattawut (2014)
<i>I. aquatica</i>	C3	Humedal construido	Filtro de grafito	12.42 mW m ⁻²	Liu <i>et al.</i> (2013)
<i>G. maxima</i>	C3	Cámara climática	Gránulo de grafito	67 mW m ⁻²	Strik <i>et al.</i> (2008)
<i>G. maxima</i>	C3	Cámara climática	Gránulo de grafito	80 mW m ⁻²	Timmers <i>et al.</i> (2012)
<i>S. anglica</i>	C4	Saturación de agua	Filtro de grafito	79 mW m ⁻²	Timmers <i>et al.</i> (2013)
<i>S. anglica</i>	C4	Saturación de agua	Filtro de grafito	222 mW m ⁻²	Helder <i>et al.</i> (2010)
<i>E. crassieps</i>	C4	Sistema bentónico en miniatura	Discos de grafito	224.93 mW m ⁻²	Venkata <i>et al.</i> (2011)
<i>E. glabrescens</i>	C4	Ambiente	Fibra de carbón	0.09 mW m ⁻²	Bombelli <i>et al.</i> (2013)
<i>P. setaceum</i>	C4	Ambiente	Grafito	163 mW m ⁻²	Chiranjeevi <i>et al.</i> (2012)
<i>S. hybridum</i>	CAM	Insaturación de agua	Varilla de grafito	0.092 μW m ⁻²	Tapia <i>et al.</i> (2017)
<i>S. album</i>	-	-	-	0.0024 μW m ⁻²	"
<i>S. sexangulare</i>	-	-	-	0.0084 μW m ⁻²	"
<i>S. rupestre</i>	-	-	-	0.0155 μW m ⁻²	"
<i>S. reflexum</i>	-	-	-	> 0.001 μW m ⁻²	"
<i>S. spurium</i>	-	-	-	> 0.001 μW m ⁻²	"
<i>S. kamtschaticum</i>	-	-	-	> 0.001 μW m ⁻²	"
<i>C. floribunda</i>	N/A	Suelo de jardín	Cátodo de grafito	0.21 mW m ⁻²	Azri <i>et al.</i> (2018)

Cuadro 1.3 (Continuado)

Especies de plantas	Tipos de plantas	Condición de operación	Tipos de electrodos	Densidad de potencia máxima	Referencias
<i>O. albicarpa</i>	CAM	Ambiente	Filtro de grafito	4.32 mW m ⁻²	Apollon <i>et al.</i> (2020)
<i>O. ficus-indica</i>	CAM	Ambiente	Filtro de grafito	0.44 mW m ⁻²	"
<i>O. robusta</i>	CAM	Ambiente	Filtro de grafito	0.31 mW m ⁻²	"
<i>O. joconostle</i>	CAM	Ambiente	Filtro de grafito	0.02 mW m ⁻²	"

Nota: todos los experimentos se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones de agua.

1.4.7. Mediciones y cálculos de bioelectricidad

1.4.7.1. Voltaje de la Celda

El voltaje de las P-MFC se mide con el apoyo de multímetro, además también, se puede medir de manera automática utilizando un registrador automático de datos conectado a computadora personal. Tapia *et al.* (2017) realizaron un estudio para detectar el contenido de agua del agua del suelo en techos verdes con una P-MFC, monitorearon el voltaje (una vez a la semana) de la celda usando un multímetro UT55 (Uni-Trend Technology Limited, Dongguan, China) durante un periodo de 280 días de la puesta en marcha del sistema. Posteriormente, los datos fueron monitoreados cada 10 minutos utilizando el registrador de datos EM50 (Decagon®, Pullman, WA, EE. UU.). Por otra parte, se midió el potencial de la celda en línea con módulos de Fieldpoint (instrumento de adquisición de datos) conectado a una computadora personal con el software Labview (Timmers *et al.*, 2010), así como también, se implementó un sistema de monitoreo de voltaje, con un microcontrolador Arduino 250 mega, para celdas de combustible que emplean plantas de nopal (Maldonado-Ruelas *et al.*, 2018).

1.4.7.2. Curva de polarización

Según Logan y Regan (2006), una curva de polarización es la variación de resistencias externas, aplicadas a las P-MFC. En este proceso, la resistencia se debe de cambiar en un intervalo de tiempo que oscila entre 5 y 10 min); el proceso se debe de repetir

(mínimo dos veces) para obtener datos precisos. Después, mediante la Ley de Ohm se calculará la corriente en amperios (A).

1.4.7.3. Salida de potencia, corriente y densidad de potencia

La potencia en watts (W) se calcula a partir de la ecuación $W = V \cdot A$. La generación de energía o consumo debería ser medida durante todo el periodo del experimento y expresada en watts-hora (Wh). Se calcula utilizando la siguiente ecuación: $W = W.h$. Luego, la producción total de electricidad se calcula utilizando la ecuación: $(J/m^2) = \Sigma P \cdot t$; donde P = densidades de potencia promedio en Wm^2 durante una semana y t = una semana (604,800 s) (Helder *et al.*, 2012). Las densidades de corriente y de potencia se normalizan al área de superficie de la membrana en m^2 (Timmers *et al.*, 2013), que es igual al área de crecimiento de la planta y al volumen de P-MFC en m^3 . La densidad de corriente se calcula mediante la fórmula: $I = \frac{V}{\alpha R}$; donde α es el área del electrodo.

1.4.7.4. P-MFC en circuito cerrado

Se implementa después de la obtención de la realización de la curva de polarización, seleccionando la resistencia que indica la potencia máxima de salida en la P-MFC. Primeramente, se conectan los compartimentos anódico y catódico con la resistencia seleccionada durante un determinado periodo. Luego, se analizan los datos mediante la Ley de Ohm para determinar las densidades de corriente y de potencia.

1.5. Factores que afectan el desempeño de las P-MFC

Se han reportado varios factores que afectan la generación de electricidad con sistema bioelectroquímico basado en plantas. Moqsud *et al.* (2015a), reportaron que el tiempo y la radiación solar son dos factores cruciales en el uso de este tipo de tecnología, cuando utilizaron el cultivo de arroz bajo condiciones de inundación; agregando compost como fuente para aumentar el rendimiento de las P-MFC. Posteriormente, el sistema se monitoreó por un periodo de 109 días, donde se encontró un voltaje máximo de 700 mV a los 37 días, con una radiación solar de 27 mJ/m². Sin embargo, la producción de electricidad bajó considerablemente cuando las plantas de arroz estaban listas para ser cosechadas. Por lo tanto, el tipo de suelo (Dunaj *et al.*, 2012), la profundidad del suelo, el agua y la temperatura son otros factores que afectan la generación de energía con celdas de combustible microbiana (Deng *et al.*, 2014).

Por otra parte, otros factores han sido reportados en estudios previos para la generación de electricidad por BES. Así que, para Lauber *et al.* (2009) el pH del suelo; la estructura del suelo (Wikelin *et al.*, 2008); la textura del suelo (Sessitsch *et al.*, 2001); y la disponibilidad de nitrógeno (Frey *et al.*, 2004) son promotores en la formación de poblaciones de microorganismos. De acuerdo con Patrik (1981), la materia inorgánica presente en el suelo puede afectar el potencial redox; por lo tanto, el suelo sufre de manera continua reacciones redox (Vepraskas y Faulkner, 2001). Por otro lado, el suelo produce electrones mediante la descomposición de químicos, ácido húmico (De Schamphelaire *et al.*, 2008) y hierro (II) (Meek y Chesworth, 2008).

1.5.1. Desafíos

El desafío más relevante del sistema P-MFC es su bajo rendimiento con respecto a la generación de bioelectricidad. En consecuencia, se requieren realizar más investigaciones para (i) mejorar el diseño de P-MFC, la configuración y modificación de los electrodos, con el objetivo de optimizar las condiciones de operación para su uso comercial (Zhao *et al.*, 2017), así como (ii) la selección de especies de plantas adecuadas con hábitos de crecimiento únicos, las cuales sean capaces de liberar compuestos orgánicos a través de sus raíces y que éstos son descompuestos por las EAB; transfiriendo electrones para la generación de bioelectricidad (Kabutey *et al.*, 2019). Otros dos desafíos de este sistema son mantener las plantas vivas mientras producen energía estable y evitar el deterioro de los materiales del electrodo con el tiempo (Nitorisavut y Regmi, 2017).

1.6. Aplicación en tiempo real de PMFC: LED, sensores y transmisión de datos

Las P-MFC a lo largo del tiempo tomaron un papel muy importante, debido a que tienen múltiples aplicaciones que incluyen el monitoreo de la biodetección de la madurez de las plantas (Chen *et al.*, 2012), el tratamiento de agua (Nattawut, 2014), las condiciones ambientales (Donovan *et al.*, 2008) y la recuperación de metales pesados de ambientes contaminados (Li *et al.*, 2019).

En 2009, se desarrolló un prototipo de 28 L MFC para el tratamiento de aguas residuales (Lefebvre *et al.*, 2009). Aunque este diseño necesitaba ser optimizado, la MFC mostró promesas, generando electricidad muy estable durante un periodo de

cuatro meses. El voltaje máximo logrado en circuito abierto fue de 0.8 V. Posteriormente, Hiegemann *et al.* (2019) usaron un módulo prototipo MFC sumergible con una capacidad de 255 L, para tratar aguas residuales municipales durante un largo tiempo desde su puesta en marcha. La densidad de potencia máxima para este sistema fue de 78 mW m⁻². Por otra parte, Rossi *et al.* (2019) hicieron pruebas con otro prototipo de 85 L MFC con el cátodo más grande usando aguas residuales como combustible, alcanzando una densidad de potencia máxima de 83 mW m⁻². Adicionalmente, Apollon *et al.* (2020) desarrollaron un novedoso prototipo para la generación de bioelectricidad en un ecosistema semiárido. Se conectaron 12 reactores en series para alimentar un LED y un reloj digital (Figura 1.8) durante una semana. Los resultados mostraron una producción de voltaje inicial de 3 V, el cual después disminuyó a un 18 % (2.46 V) al final de la prueba. Durante este ensayo, se logró una densidad de potencia promedio de 489.02 mW m⁻² por área de producción. La aplicación de estos prototipos ha demostrado que la tecnología MFC es una buena impulsora de bioelectricidad.

Otras aplicaciones que podría tener un sistema P-MFC, es su instalación en un sistema hidropónico en ambientes controlados (invernadero); así como la remediación del suelo, el manejo de enfermedades de las plantas (Nitorisavut y Regmi, 2017) y biosensores (Chiranjeevi *et al.*, 2019). Estas, son áreas potenciales de aplicación de esta tecnología.



Figura 8. Prototipo alimentando LED y reloj digital. De izquierda a derecha: conexión de 12 P-MFC, multímetro monitoreando el voltaje y la aplicación en tiempo real de los dispositivos.

1.7. Conclusiones

Las tecnologías P-MFC son sistemas bioelectroquímicos que son sostenibles, alternativas renovables y ecológicos a las fuentes de energía tradicional que deben ser investigadas más a fondo para responder a la actual escasez de energía en el mundo, así como reducir la sobreutilización de otras fuentes de energía nocivas. Además, P-MFC es una opción prometedora para generar bioelectricidad en comparación con las MFC convencionales. La generación inicial de bioelectricidad ha aumentado de manera prometedora con un 90,13%. (67 mW m^{-2} – 679 mW m^{-2} por área de crecimiento vegetal). El mejoramiento de generación de densidad de potencia a largo

plazo de una P-MFC, depende de factores tales como: (i) tipos de materiales de electrodos, (ii) tipos de membranas y (iii) especies vegetales adecuadas (con alta rizodeposición). *Spartina anglica* parece ser una buena alternativa para la mejora de P-MFC bajo condiciones de saturación. Para una aplicación a gran escala en el laboratorio, se recomienda usar esta especie de planta. La membrana de intercambio aniónico también mejora la salida de potencia en comparación con la membrana de intercambio catiónico debido a la transferencia de iones fosfato e hidróxido cargado. Además, el uso de una membrana de intercambio aniónico o catiónico permite la producción y recuperación de materias primas (productos químicos), tales como peróxido de hidrógeno y soluciones cáusticas en MFC. Por último, se requieren plantas capaces de liberar mayores compuestos orgánicos y también un desarrollo tecnológico más eficiente para una mayor tasa de transferencia de electrones aplicando este sistema donde hay una escasez de energía.

Referencias

- Ali, S. M. H., Lenzen, M., Sack, F. & Yousefzadeh, M. (2020). Electricity generation and demand flexibility in wastewater treatment plants: Benefits for 100% renewable electricity grids. *Appl. Energy*, 268, 114960.
- Angioni, S., Millia, L., Mustarelli, P., Doria, E., Temporiti, M.E.... & Quartarone, E. (2018). Photosynthetic microbial fuel cell with polybenzimidazole membrane: synergy between bacteria and algae for wastewater removal and biorefinery. *Heliyon* 4, 1–26.
- Apollon, W., Sathish-Kumar, K., Silos-Espino, H., Perales-Segovia, C., Valera-Montero, L. L.... & Gómez-Leyva, J. F. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: demonstration of their applications. *Appl Energy*, 279(23), 115788.
- Araneda, I., Tapia, N., Lizama Allende, K. & Vargas, I. (2018). Constructed Wetland-Microbial Fuel Cells for Sustainable Greywater Treatment. *Water*, 10(7), 940.
- Azri, Y. M., Tou, I., Sadi, M. & Benhabyles, L. (2018). Bioelectricity generation from three ornamental plants: *Chlorophytum comosum*, *Chasmanthe floribunda* and *Papyrus diffusus*. *Int J Green Energy*, 15(4):254–63.
- Azuma, M. & Ojima, Y. (2018). Catalyst Development of Microbial Fuel Cells for Renewable-Energy Production. [10.5772/intechopen.81442](https://doi.org/10.5772/intechopen.81442).
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E. V., Bouquelet, S. & Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*, 249, 271–277.
- Bazdar, E., Roshandel, R., Yaghmaei, S. & Mardanpour, M. M. (2018). The effect of different light intensities and light/dark regimes on the performance of

- photosynthetic microalgae microbial fuel cell. *Bioresour Technol*, 261(15), 350–360.
- Bombelli, P., Dennis, R. J., Felder, F., Cooper, M. B., Madras Rajaraman Iyer, D. ... & Howe, C. J. (2016). Electrical output of bryophyte microbial fuel cell systems is sufficient to power a radio or an environmental sensor. *R Soc Open Sci*, 3(10), 160249.
- Bombelli, P., Iyer, D. M. R., Covshoff, S., McCormick, A. J., Yunus, K. & Hibberd, J. M. (2013). Comparison of power output by rice (*Oryza sativa*) and an associated weed (*Echinochloa glabrescens*) in vascular plant bio-photovoltaic (VP-BPV) systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(1), 429–438.
- Chen, Z., Huang, Y. C., Liang, J. H., Zhao, F. & Zhu, Y. G. (2012). A novel sediment microbial fuel cell with a biocathode in the rice rhizosphere. *Bioresour. Technol*, 108(6), 55–59.
- Chiranjeevi, P., Chandra, R. & Mohan, S. V. (2013). Ecologically engineered submerged and emergent macrophyte based system: an integrated eco-electrogenic design for harnessing power with simultaneous wastewater treatment. *Ecol Eng*, 51(2):181–90.
- Chiranjeevi, P., Mohanakrishna, G. & Mohan, S. V. (2012). Rhizosphere mediated electrogenesis with the function of anode placement for harnessing bioenergy through CO₂ sequestration. *Bioresour. Technol*, 124(22), 364–370.
- Chiranjeevi, P., Yeruva, D. K., Kumar, A. K., Mohan, S. V. & Varjani, S. (2019). Plant-Microbial Fuel Cell Technology. *Microbial Electrochemical Technology*, p. 549–564.
- Chouler, J., Monti, M. D., Morgan, W. J., Cameron, P. J. & Di Lorenzo, M. (2019). A photosynthetic toxicity biosensor for water. *Electrochim. Acta*, 309(17), 392–401.

- Colombo, A., Marzorati, S., Lucchini, G., Cristiani, P., Pant, D. & Schievano, A. (2017). Assisting cultivation of photosynthetic microorganisms by microbial fuel cells to enhance nutrients recovery from wastewater. *Bioresour Technol*, 237(15), 240–248.
- Commault, A. S., Laczka, O., Siboni, N., Tamburic, B., Crosswell, J. R... & Ralph, P. J. (2017). Electricity and biomass production in a bacteria-*Chlorella* based microbial fuel cell treating wastewater. *J. Power Sources*, 356(20), 299–309.
- Croese, E., Pereira, M. A., Euverink, G. J., Stams, A. J., & Geelhoed, J. S. (2011). Analysis of the microbial community of the biocathode of a hydrogen-producing microbial electrolysis cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 92(5), 1083–1093.
- Cui, Y., Rashid, N., Hu, N., Rehman, M. S. Ur & Han, J. (2014). Electricity generation and microalgae cultivation in microbial fuel cell using microalgae-enriched anode and bio-cathode. *Energy Convers. Manag*, 79(3), 674–680.
- De Schamphelaire, L., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M.W., Boon, N. & Verstraete, W. (2010). Microbial community analysis of anodes from sediment microbial fuel cells powered by rhizodeposits of living rice plants. *Appl. Environ. Microbiol*, 76(6), 2002–2008.
- De Schamphelaire, L., Rabaey, K., Boeckx, P., Boon, N. & Verstraete, W. (2008) Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. *Microb. Biotechnol*, 1(6), 446–462.
- Deng, H., Chen, Z. & Zhao, F. (2012). Energy from Plants and Microorganisms: Progress in Plant-Microbial Fuel Cells. *ChemSusChem*, 5(6), 1006–1011.
- Deng, H., Wu, Y. C., Zhang, F., Huang, Z. C., Chen, Z.... & Zhao, F. (2014). Factors affecting the performance of single-chamber soil microbial fuel cells for power generation. *Pedosphere*, 24(3), 330–338.
- Dharmalingam, S., Kugarajah, V. & Sugumar, M. (2019). Membranes for Microbial Fuel Cells. *Microbial Electrochemical Technol*, 143–194.

- Doherty, L., Zhao, Y., Zhao, X., Hu, Y., Hao, X. & Xu, L. (2015). A review of a recently emerged technology: constructed wetland–microbial fuel cells. *Water Res*, 85, 38–45.
- Donovan, C., Dewan, A., Heo, D. & Beyenal, H. (2008). Batteryless, wireless sensor powered by a sediment microbial fuel cell. *Environ Sci Technol.*, 42(22), 8591–6.
- Dunaj, S., Vallino, J., Hines, M., Gay, M., Kobyljanec, C. & Rooney-Varga, J. (2012). Relationships between Soil Organic Matter, Nutrients, Bacterial Community Structure, and the Performance of Microbial Fuel Cells. *Environ Sci Technol*, 46, 1914–22.
- Esteve-Núñez, A. (2008). Bacterias productoras de electricidad. *Revista Actualidad Sociedad Española de Microbiología*, 38–43.
- Ezziat, L., Elabed, A., Ibnsouda, S. & El Abed, S. (2019). Challenges of Microbial Fuel Cell Architecture on Heavy Metal Recovery and Removal from Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 7, 1.
- Frey, S. D., Knorr, M., Parrent, J. L. & Simpson, R. T. (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *For Ecol Manag*, 196, 159–171.
- Gajda, I., Greenman, J., Melhuish, C. & Ieropoulos, I. (2015). Self-sustainable electricity production from algae grown in a microbial fuel cell system. *Biomass Bioenergy*, 82, 87–93.
- Ghasemi, M., Daud, W. R. W., Ismail, A. F., Jafari, Y., Ismail, M., Mayahi, A. & Othman, J. (2013). Simultaneous wastewater treatment and electricity generation by microbial fuel cell: performance comparison and cost investigation of using Nafion 117 and SPEEK as separators. *Desalination*, 325, 1–6.

- Gonzalez Olias, L., Cameron, P. J. & Di Lorenzo, M. (2019). Effect of Electrode Properties on the Performance of a Photosynthetic Microbial Fuel Cell for Atrazine Detection. *Frontiers in Energy Research*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00105>
- Gouveia, L., Neves, C., Diego, S., Nobre, B. P. & Cristina, T. (2014). Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a photosynthetic alga microbial fuel cell. *Bioresour Technol*, 144, 171–177.
- Guadarrama-Pérez, O., Gutiérrez-Macías, T., García-Sánchez, L., Guadarrama-Pérez, V. H. & Estrada-Arriaga, E. B. (2019). Recent advances in constructed wetland-microbial fuel cells for simultaneous bioelectricity production and wastewater treatment: A review *Int J Energy Res*, 43, 5106–5127.
- Heijne, T. A., Hamelers, H. V. M., De Wilde, V., Rozendal, R. A. & Buisman, C. J. N. (2006). A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells, *Environ. Sci. Technol*, 40, 5200–5205.
- Helder, M., Strik, D., Hamelers, H., Kuhn, S., Blok, C. & Buisman C. (2010). Concurrent bio-electricity and biomass production in three Plant-Microbial Fuel Cells using *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* and *Arundo donax*. *Bioresource Technology*, 101, 3541–3547.
- Helder, M., Strik, D.P., Timmers, R.A., Raes, S.M., Hamelers, H.V. & Buisman, C.J. (2013). Resilience of roof-top plant-microbial fuel cells during dutch winter. *Biomass Bioenergy*, 51, 1–7.
- Helder, M., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Kuijken, R.C.P. & Buisman, C.J.N. (2012a). New plantgrowth medium for increased power output of the Plant-Microbial Fuel Cell. *Bioresour Technol*, 104, 417–423.
- Helder, M., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M. & Buisman, C.J.N. (2012b). The flat-plate plant microbial fuel cell: The effect of a new design on internal resistances. *Biotechnol Biofuels*, pp.70 – Article in Press.

- Hiegemann, H., Littfinski, T., Krimmler, S., Lübken, M., Klein, D., Schmelz, K.-G....& Wichern, M. (2019). Performance and inorganic fouling of a submergible 255 L prototype microbial fuel cell module during continuous long-term operation with real municipal wastewater under practical conditions. *Bioresour Technol*, 122227.
- Hou, Q., Cheng, J., Nie, C., Pei, H., Jiang, L., Zhang, L. & Yang, Z. (2017). Features of *Golenkinia* sp. and microbial fuel cells used for the treatment of anaerobically digested effluent from kitchen waste at different dilutions. *Bioresour. Technol*, 240, 130–136.
- Hou, Q., Pei, H., Hu, W., Jiang, L. & Yu, Z. (2016). Mutual facilitations of food waste treatment, microbial fuel cell bioelectricity generation and *Chlorella vulgaris* lipid production. *Bioresour Technol*, 2013, 50–55.
- Huan, D., Zheng, C. & Feng, Z. (2012). Energy from Plants and Microorganisms: Progress in Plant–Microbial Fuel Cells. *ChemSusChem*, 5, 1006–1011.
- Huarachi-Olivera, R., Dueñas-Gonza, A., Yapo-Pari, U., Vega, P., Romero-Ugarte, M., Tapia, J., Molina, L., Lazarte-Rivera, A., Pacheco-Salazar, D.G. & Esparza, M., 2018. Bioelectrogenesis with microbial fuel cells (MFC) using the microalga *Chlorella vulgaris* and bacterial communities. *Electron. J. Biotechnol*, 31, 34–43.
- Hubenova, Y. & Mitov, M. (2011). Bacterial mutualism in the mosses roots applicable in Bryophyta-microbial fuel cell. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 76, 63–65
- IPCC Working Group III. Report 'Mitigation of Climate Change'. Bangkok, 2007.
- Kabutey, F. T., Zhao, Q., Wei, L., Ding, J., Antwi, P., Quashie, F. K. & Wang, W. (2019). An overview of plant microbial fuel cells (PMFC): Configurations and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 110, 402–414.
- Kakarla, R. & Min, B. (2019). Sustainable electricity generation and ammonium removal by microbial fuel cell with a microalgae assisted cathode at various environmental conditions. *Bioresource Technology*, 284, 161–167.

- Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y. & Watanabe, K. (2008). Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 43–49.
- Kamaraj, S.-K., Rivera, A. E., Murugesan, S., García-Mena, J., Maya, O., Frausto-Reyes, C...& Caballero-Briones, F. (2019). Electricity generation from Nopal biogas effluent using a surface modified clay cup (cantarito) microbial fuel cell. *Heliyon*, 5, e01506.
- Kamaraj, Y., Punamalai, G., Kandasamy, S. & Kasinathan, K. (2020). Influence of long-term organic and conventional fertilization on bacterial communities involved in bioelectricity production from paddy field-microbial fuel cells. *Arch Microbiol*, 202(8), 2279–2289
- Khandelwal, A., Vijay, A., Dixit, A. & Chhabra, M. (2018). Microbial fuel cell powered by lipid extracted algae: A promising system for algal lipids and power generation. *Bioresource Technology*, 247, 520–527.
- Labro, J., Craig, T., Wood, S. A. & Packer, M. A. (2017). Demonstration of the use of a photosynthetic microbial fuel cell as an environmental biosensor. *Int.J. Nanotechnol.* 14, 213.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R. & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol.*, 75, 5111–5120.
- Lee, D.-J., Chang, J.-S. & Lai, J.-Y. (2015). Microalgae–microbial fuel cell: A mini review. *Bioresource Technology*, 198, 891–895.
- Lefebvre, O., Cheng, Y. P., Al-Mamun, A., Tang, Z., Chua, D. H. C. & Yong Ng, H. (2009). Conception of a Prototype Microbial Fuel Cell for Wastewater Treatment. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2009, 516–526.

- Lefebvre, O., Shen, Y., Tan, Z., Uzabiaga, A., Chang, I. S. & Ng, H.Y. (2011). A comparison of membranes and enrichment strategies for microbial fuel cells, *Bioresour. Technol*, 102, 6291–6294.
- Li, H., Qu, Y., Tian, Y. & Feng, Y. (2019). The plant-enhanced bio-cathode: root exudates and microbial community for nitrogen removal. *J Environ Sci.*, 77, 97–103.
- Li, W.-W, Sheng, Q.-P., Liu, X.W. & Yu, H.Q. (2011). Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102 (1), 44–252.
- Li, X., Wang, X., Zhao, Q., Wan, L., Li, Y. & Zhou, Q. (2016). Carbon fiber enhanced bioelectricity generation in soil microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron*, 85, 135–141.
- Liu, H. & Logan, B. E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 4040–4046.
- Liu, H., Cheng, S. & Logan, B. (2005). Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*, 39, 658–62.
- Liu, S., Song, H., Li, X. & Yang, F. (2013). Power generation enhancement by utilizing plant photosynthate in microbial fuel cell coupled constructed wetland system. *Internatl J Photoenergy*, 2013, 1–10.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. ... & Rabey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science and Technology Journal*, 40(17), 5181–5192.
- Logan, B.E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1665–1671.
- Lojou, E. (2011). Hydrogenases as catalysts for fuel cells: strategies for efficient immobilization at electrode interfaces. *Electrocim Acta*, 56(28), 10385–10397.

- Lojou, E. B. & Bianco, P. (2004). Electrocatalytic reactions at hydrogenase-modified electrodes and their applications to biosensors: from the isolated enzymes to the whole cells. *Electroanalysis*, 16, 1093–1100.
- Lovely, D. R. (2006). Buig juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 497–508.
- Lowy, D. A., Tender, L. M., Zeikus, J. G., Park, D. H. & Lovley, D. R. (2006). Harvesting energy from the marine sediment–water interface II: kinetic activity of anode materials. *Biosens Bioelectron*, 21, 2058–63.
- Lu, L., Xing, D. & Ren, Z. J. Microbial community structure accompanied with electricity production in a constructed wetland plant microbial fuel cell. *Bioresour Technol*, 195, 115–21.
- Maldonado-Ruelas, V.A., Ortiz–Medina, R.A., Apollon, W. & Silos-Espino, H. (2018). Diseño e implementación de un sistema de adquisición de voltaje para celdas de combustible basadas en nopal. *Revista de Energías Renovables*, 2(7), 19–25.
- Martinucci, E., Pizza, F., Perrino, D., Colombo, A., Trasatti, S. P. M., Lazzarini Barnabei, A.... & Cristiani, P. (2015). Energy balance and microbial fuel cells experimentation at wastewater treatment plant Milano-Nosedo. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 14683–14689.
- Meek, B. D. & Chesworth, W. (2008). Redox Reactions and Diagrams in Soil. *Encyclopedia of Soil Science*. Springer. p. 600–5.
- Modestra, J. A., Chiranjeevi, P. & Mohan, S. V. (2016). Cathodic material effect on electron acceptance towards bioelectricity generation and wastewater treatment. *Renew. Energy*, 98, 178–187.
- Mohan, S. V., Mohanakrishna, G., Chiranjeevi, P., Peri, D. & Sarma, P. N. (2010). Ecologically engineered system (EES) designed to integrate floating, emergent and submerged macrophytes for the treatment of domestic sewage and acid rich

- fermented-distillery wastewater: evaluation of long term performance. *Bioresour Technol*, 101(10), 3363–70.
- Moqsud, M., Azizul Hannan, M.A. & Omine, K. (2015). Assessment of factors influencing bioelectricity generation in paddy plant microbial fuel cells. *Global Adv. Res. J. of Agricult. Sc*, 4(12), 840–850.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411, 948–50.
- Naina Mohamed, S., Pohekar Ajit, H., Muthukumar, K. & Tamilmani, J. (2020). Bioelectricity production from kitchen wastewater using microbial fuel cell with photosynthetic algal cathode, *Bioresour Technol*, 295, 122226.
- Narasimhan, K., Chanbash, B., Bajic, V.B. & Swarup, S. (2003). Enhancement of plant-microbe interactions using a rhosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiology*, 132, 146–153.
- Nattawut, K. K. H. (2014). Electricity generation of plant microbial fuel cell (PMFC) using *Cyperus Involucratus* R. *KKU Eng J*, 42,117–24.
- Nitorisavut, R. & Regmi, R. (2017). Plant microbial fuel cells: A promising biosystems engineering, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 81–89.
- O'Connell, K. P., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (1996). Engineering the rhizosphere: expressing a bias. *Trends Biotechnology*, 14, 84–88.
- Oon, Y. L., Ong, S. A., Ho, L. N., Wong, Y. S., Dahalan, F. A. & Oon, Y. S. (2017). Role of macrophyte and effect of supplementary aeration in up-flow constructed wetland-microbial fuel cell for simultaneous wastewater treatment and energy recovery. *Bioresour Technol*, 224, 265–75.
- Patrick Jr, W. (1981). The role of inorganic redox systems in controlling reduction in paddy soils. In: *Proceedings of Symposium on Paddy Soils*: Springer. pp. 107–17.

- Pieterse, A. H. & Murphy, K. J editors. (1990). Aquatic weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation. first ed. Oxford: Oxford University Press; 593 pp. <https://www.cabi.org/isc/abstract/19901182891>
- Piyare, R., Murphy, A. L., Tosato, P. & Brunelli, D. (2017). Plug into a plant: using a plant microbial fuel cell and a wake-up radio for an energy neutral sensing system IEEE Proceedings of 2017 IEEE 42nd conference on local computer networks workshops (LCN workshops) Singapore: IEEE Press; Oct 9. p. 18–25.
- Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A. & Oh, S.-E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: a review. *Alexandr. Eng. J.*, 54, 745–756.
- Regmi, R., Nitorisavut, R. & Ketchaimongkol, J. (2018). A decade of plant-assisted microbial fuel cells: looking back and moving forward. *Biofuel Bioprod Bior*, 1–8.
- Rossi, R., Jones, D., Myung, J., Zikmund, E., Yang, W., Gallego, Y. A. ...& Logan, B.E. (2019). Evaluating a multi-panel air cathode through electrochemical and biotic tests. *Water Res*, 148, 51–59.
- Rothballer, M., Picot, M., Sieper, T., Arends, J. B., Schmid, M. & Hartmann, A. (2015). Monophyletic group of unclassified γ -Proteobacteria dominates in mixed culture biofilm of high-performing oxygen reducing biocathode. *Bioelectrochem*, 106, 167–76.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M. & Buisman, C. J. N. (2006). Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance†. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5206–5211.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M., Rabaey, K., Keller, J. & Buisman, C. J. N. (2009). Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment, *Trends Biotechnol*, 26, 450–459.

- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: from fundamentals to applications: a review. *J Power Sources*, 356:225–244.
- Sathish-Kumar, K., Vignesh, V. & Caballero-Briones, F. (2017). Sustainable Power Production from Plant-Mediated Microbial Fuel Cells. In: Dhanarajan A. (eds) *Sustainable Agriculture towards Food Security*. Springer, Singapore. pp 85–107.
- Schievano, A., Colombo, A., Grattieri, M., Trasatti, S. P., Liberale, A., Tremolada, P.,...& Cristiani, P. (2017). Floating microbial fuel cells as energy harvesters for signal transmission from natural water bodies. *J Power Sources*, 340, 80–88.
- Schwartz, E. & Friedrich, B. (2006). The H₂-metabolizing prokaryotes. In: Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG, editors. *Prokaryotes*. Stuttgart: Thieme, pp. 497-563
- Scott, K. (2016a). An Introduction to Microbial Fuel Cells. *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 3–27.
- Scott, K. (2016b). *Membranes and separators for microbial fuel cells*. Woodhead Publishing, pp153–178.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4215–24.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lee, T.M. & Chang, J.S. (2015). Microbial drying and cell disruption – recent advances. *Bioresour Technol*, 184, 258–266.
- Singh, H. M., Pathak, A. K., Chopra, K., Tyagi, V. V., Anand, S. & Kothari, R. (2018). Microbial fuel cells: a sustainable solution for bioelectricity, generation and wastewater treatment. *Biofuels*.1–21.
- Sondhi, R., Bhave, R. & Jung, G. (2003). Applications and benefits of ceramic membranes, *Membr. Technol*, 11, 5–8.

- Strik, D. P. B. T. B., Snel, J. F. H. & Buisman, C. J. N. (2008b). Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870–876.
- Strik, D. P. B. T. B., Timmers, R. A., Helder, M., Steinbusch, K. J. J, Hamelers, H. V. M. & Buisman, C.J. N. (2011). Microbial solar cells: applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends Biotechnol.* 29, pp. 41–49.
- Sudirjo, E., Buisman, C. J. N. & Strik, D. P. B. T. B. (2019b). Activated Carbon Mixed with Marine Sediment is Suitable as Bioanode Material for *Spartina anglica* Sediment/Plant Microbial Fuel Cell: Plant Growth, Electricity Generation, and Spatial Microbial Community Diversity. *Water*, 11, 1810.
- Sudirjo, E., Pim de Jager, Buisman, C. J. N. & Strik, P.B.T.B. (2019a). Performance and Long Distance Data Acquisition via LoRa Technology of a Tubular Plant Microbial Fuel Cell Located in a Paddy Field in West Kalimantan, Indonesia. *Sensor*, 19, 46–47.
- Takanezawa, K., Nishio, K., Kato, S., Hashimoto, K. & Watanabe, K. (2010). Factors affecting electric output from rice-paddy microbial fuel cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 1271–3.
- Tang, H., Guo, K., Li, H., Du, Z. & Tian, J. (2010). Microfiltration membrane performance in two-chamber microbial fuel cells, *Biochem. Eng. J.*, 52, 194–198.
- Tapia, N.F., Claudia R., Carlos, A.B. & Ignacio T.V. (2017). Evaluation of Sedum as driver for plant microbial fuel cells in a semi-arid green roof ecosystem. *Ecol Eng.* 108, 203–210.
- Timmers, R. A., Strik, D. P. B. T. B., Hamelers, H. V. M. & Buisman, C. J. N. (2013). Electricity generation by a novel design tubular plant microbial fuel cell. *Biomass Bioenergy*, 5:60–67.
- Timmers, R.A., Rothballer, M., Strik, D.P., Engel, M., Schulz, S., Schloter, M., Hartmann, A., Hamelers, B. & Buisman, C.J.N. (2012). Microbial community

- structure elucidates performance of *Glyceria maxima* plant microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 537–548.
- Timmers, R.A., Strik, D.P., Hamelers, H.V. & Buisman, C.J. (2010). Long-term performance of a plant microbial fuel cell with *Spartina anglica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 973–981.
- Ueoka, N., Sese, N., Sue, M., Kouzuma, A. & Watanabe, K. (2016). Sizes of Anode and Cathode Affect Electricity Generation in Rice Paddy-Field Microbial Fuel Cells. *J Sustain Bioenergy Syst*, 06, 10–5.
- Venkata, M. S., Mohanakrishna, G. & Chiranjeevi, P. (2011). Sustainable power generation from floating macrophytes based ecological microenvironment through embedded fuel cells along with simultaneous wastewater treatment. *Bioresour Technol.*, 102, 7036–42.
- Vepraskas, M. J. & Faulkner, S. (2008). Redox chemistry of hydric soils. *Wetland soils: Genesis, hydrology, landscapes, and classification*. pp. 85,105.
- Vincent, K. A., Parkin. A. & Armstrong, F.A. (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem Rev.* 107, 4366–4413.
- Vymazal, J. (2011). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. *Hydrobiologia*, 674(1):133–56.
- Wakelin, S. A., Macdonald, L. M., Rogers, S. L., Gregg, A. L., Bolger, T. P. & Baldock, J. A. (2008). Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biol Biochem*, 40:803–13.
- Wang, C., Guo, L., Li, Y. & Wang, Z. (2012). Systematic Comparison of C₃ and C₄ plants based on metabolic network analysis. *BMC Syst Biol*, 6, S9–S.
- Wang, L., Zhou, Y., Peng, F., Zhang, A., Pang, Q., Lian, J. & Cui, Y. (2020). Intensified nitrogen removal in the tidal flow constructed wetland-microbial fuel cell: Insight into evaluation of denitrifying genes. *J. Clean. Prod.*, 121580.

- Wang, X., Feng, Y., Liu, J., Lee, H., Li, C. & Li, N. (2010). Sequestration of CO₂ discharged from anode by algal cathode in microbial carbon capture cells (MCCs). *Biosens Bioelect*, 25, 2639–43.
- Wetser, K., Dieleman, K., Buisman, C. & Strik, D. (2017). Electricity from wetlands: Tubular plant microbial fuels with silicone gas-diffusion biocathodes. *Appl Energy*, 185, 642–649.
- Xu, L., Zhao, Y., Doherty, L., Hu, Y. & Hao, X. (2016). The integrated processes for wastewater treatment based on the principle of microbial fuel cells: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 46(1), 60–91.
- Yan, Z., Jiang, H., Cai, H., Zhou, Y. & Krumholz, L. R. (2015). Complex interactions between the macrophyte *acorus calamus* and microbial fuel cells during pyrene and benzo [a] pyrene degradation in sediments. *Sci Rep*, 5, 10709.
- Zhang, Y., He, Q., Xia, L., Li, Y. & Song, S. (2018). Algae cathode microbial fuel cells for cadmium removal with simultaneous electricity production using nickel foam/graphene electrode. *Biochem. Eng. J.*, 138, 179–187.
- Zhang, Y., Zhao, Y. & Zhou, M. (2019). A photosynthetic algal microbial fuel cell for treating swine wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 26, 6182–6190.
- Zhao, Q., Yu, H., Zhang, W., Kabutey, F. T., Jiang, J., Zhang, Y., Wang, K. & Ding, J. (2017). Microbial fuel cell with high content solid wastes as substrates: a review. *Front Environ Sci Eng*, 11, 13.

CAPÍTULO 2. DESEMPEÑO DE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS DE MONITOREO DE ENERGÍA ELÉCTRICA PARA CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA BASADA EN PLANTA

2.1. Introducción

El agotamiento de los combustibles fósiles y los problemas ambientales causados por el uso excesivo de los mismos ha permitido encontrar otras alternativas para la producción de energía limpia, como la energía solar que es una fuente universal y confiable, para responder a la alta demanda de electricidad de la población mundial (Prabha et al. 2021; Maddalwar et al. 2021). Se ha reportado que la tierra recibe aproximadamente 120,000 TW (ola viajera) de energía solar al año, con una densidad de potencia de 170 W m^{-2} llegando a la superficie de la tierra, superando la demanda actual global de aproximadamente 16 TW (Sekar y Ramasamy, 2015).

Por otro lado, se han estudiado otros tipos de fuentes de energía sostenibles para producir bioelectricidad, tales como las MFC y las P-MFC, (Rusyn et al. 2021; Apollon et al., 2022a). Desde su implementación, estas tecnologías han sido estudiadas desde diferentes ángulos. Por ejemplo, la tecnología MFC se ha utilizado en diversos campos de aplicación, como el tratamiento de aguas (residuales) (Choudhury et al., 2021; Saed

et al., 2022), recuperación de nutrientes (Sharma *et al.*, 2021; Sabin *et al.*, 2022), y remediación de metales pesados (Wang *et al.*, 2022; Lam *et al.*, 2022); según lo revisado por Apollon *et al.* (2022b). Una MFC utiliza el metabolismo de los microorganismos que se adhieren al compartimiento del ánodo y el proceso electroquímico para transformar la energía química en energía eléctrica (Logan *et al.*, 2006; Rusyn, 2021). A diferencia de MFC, P-MFC es una tecnología que utiliza la actividad fotosintética de la planta para la generación continua de bioelectricidad. La tecnología P-MFC fue implementada por primera vez en 2008 por Strik y colaboradores usando la planta *Glyceria maxima* para generar bioelectricidad (Strik *et al.* 2008). Durante el experimento se alcanzó una densidad de potencia de hasta 67 mW m⁻². Más tarde, Wetser *et al.* (2015) lograron aumentar el rendimiento de la P-MFC utilizando otra especie vegetal como *Spartina anglica*. La máxima densidad de potencia encontrada en 10 min de polarización fue de 679 mW m⁻², que se redujo a 240 mW m⁻² en operación a largo plazo (dos semanas). En un sistema P-MFC operado con *Caltha palustris*, se logró un voltaje máximo y una corriente de 1454.1 mV y 11.2 mA, respectivamente (Rusyn *et al.*, 2019). Por lo tanto, el rendimiento de un sistema bioelectroquímico como la P-MFC depende en gran medida de su tipo, diseño y configuración. Además, depende de los tipos de materiales de ánodo y cátodo; y también de las especies de plantas utilizadas (Rusyn, 2021; Maddalwara *et al.*, 2021).

La P-MFC ha sido elegida como una de las fuentes seguras de generación de bioelectricidad. El uso de esta tecnología ha permitido reducir en gran medida las emisiones de gases de efecto invernadero. El uso de plantas en una MFC permite aumentar la cantidad de biomasa, así como la generación de energía sin necesidad

de cosechar las plantas (Moqsud *et al.*, 2015). Una P-MFC puede producir energía sostenible 18 veces más que el sistema convencional de sedimentos. El aumento en la generación de energía en la P-MFC se debe al aumento en la disponibilidad de materia orgánica (MO) en la cámara del ánodo debido a la oxidación microbiana (Ramadan *et al.*, 2017).

La P-MFC juega un papel importante en los sistemas agrícolas de hoy. La implementación de esta tecnología permite no solo producir energía limpia, sino también evaluar los parámetros de crecimiento de las plantas, como altura de la planta, número de brotes, diámetro del tallo, etc. (Apollon *et al.*, 2020). En estudios previos, investigadores de diferentes países han desarrollado prototipos de P-MFC para producir bioelectricidad y evaluar el crecimiento de las plantas a través del sistema P-MFC (Angelini *et al.*, 2008; Luo, 2009; Helder *et al.*, 2010; Sudirjo *et al.* 2019a). Los resultados de estas investigaciones indicaron que los sistemas P-MFC influyen en la altura de la planta, así como también en la cantidad de biomasa producida por la planta. En un estudio realizado por Apollon *et al.* (2020), se encontró que el P-MFC tuvo un efecto positivo en el parámetro altura de la planta. El mismo fenómeno se confirmó cuando las plantas recibieron dosis de 150 mg L^{-1} de nitrato de amonio (NH_4NO_3), mediante el uso de un prototipo de P-MFC instalado verticalmente en el suelo (Apollon *et al.*, 2022a). Sin embargo, las P-MFC enfrentan grandes desafíos relacionados con la generación de energía en operación a largo plazo y su aplicación a gran escala en tiempo real. En un artículo de revisión Apollon *et al.* (2021), discutieron los avances y tendencias más recientes en cuanto a configuraciones de P-MFC, los tipos de materiales de membrana, ánodo y cátodo; los factores que afectan

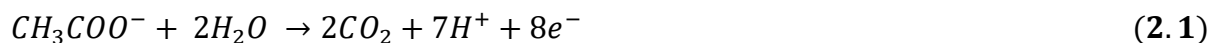
el desempeño de las tecnologías P-MFC, así como también los desafíos que enfrentan los sistemas bioelectroquímicos y sus posibles aplicaciones en tiempo real.

Por lo anterior, los objetivos principales de este estudio fueron (i) construir una P-MFC mediante la elección de materiales adecuados y de bajo costo, así como evaluar su desempeño; y (ii) diseñar un sistema de adquisición para monitorear el voltaje en tiempo real en la P-MFC.

2.2. Revisión de literatura

2.2.1. BES

Los BES son sistemas en los que al menos ocurre una de las reacciones de electrodos (anódicas y / o catódicas), las cuales están catalizadas biológicamente (Rabaey *et al.*, 2007). Los primeros prototipos de BES operados en modo galvánico se denominaron celdas de combustible microbiana (MFC), y cuando se operaban en modo electrolítico, generalmente se los denominaba celdas de electrólisis microbianas (MEC). Sin embargo, cuando se operan con plantas reciben el nombre de P-MFC. Las Ecuaciones 2.1 y 2.2 representan reacciones químicas que ocurren en los compartimentos del ánodo y cátodo, respectivamente, en una MFC de doble cámara (Figura 2.1):



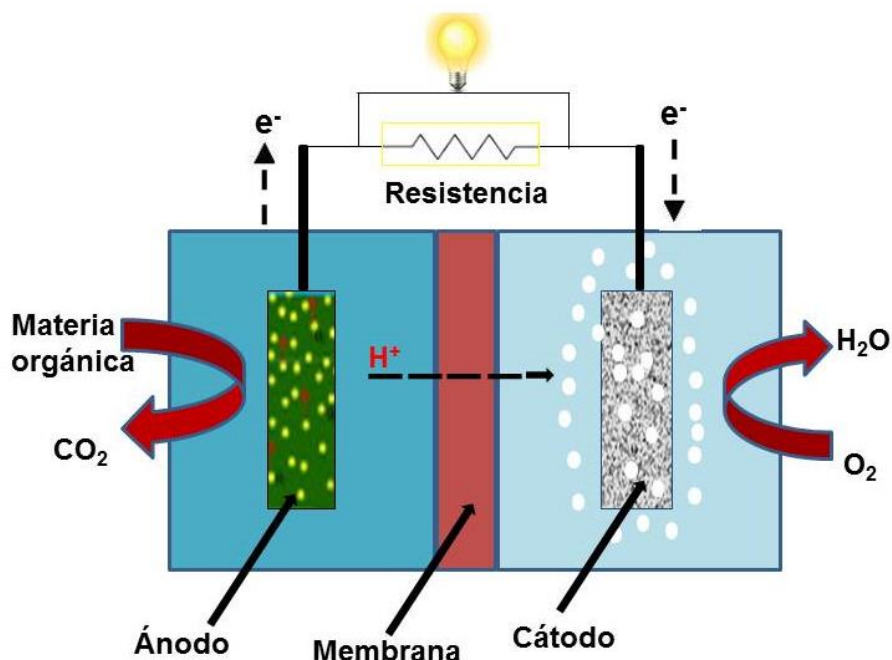


Figura 2.1. Representación esquemática de una MFC, generando electricidad mediante una resistencia (Ω) conectada a los electrodos anódico y catódico.

Un diseño de electrodo de casetes de la misma forma, pero a dos escalas diferentes: 0.6 m^2 y 1 m^2 ánodos funcionó utilizando aguas residuales domésticas estancadas; en un lugar de tratamiento real a temperatura ambiente ($8.6\text{--}15.6 \text{ }^\circ\text{C}$) por un periodo de 217 días, con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 5 horas (Cotterill *et al.*, 2017). Por lo tanto, al disminuir el espacio de los casetes y al aumentar el TRH del estudio de Heidrich, la eliminación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) fue en promedio 63.5 %. Sin embargo, la MEC solo produjo $0.004 \text{ LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con una conductividad eléctrica máxima (CE) del 27.7 % y surgieron problemas con las bacterias que consumían el hidrógeno ingresando al compartimiento del cátodo. Aunque este sistema es el más exitoso en términos de producción de energía, todavía se produjeron problemas, principalmente relacionados con la aplicación del potencial eléctrico y deterioro del material (Baeza *et al.*, 2017).

2.2.2. Tipos de aceptores de electrones y materiales utilizados en P-MFC

La estrategia de tratamiento comprende la adición de un grupo funcional o catalizador en el electrodo para facilitar la transferencia de electrones de las bacterias a la superficie del ánodo y del cátodo a los aceptores, así como también la alteración estructural de las superficies del ánodo y del cátodo acomoda más bacterias para transportar electrones. Extender el uso de las P-MFC a gran escala es inevitable en el futuro. El oxígeno es el aceptor de electrones más utilizado como cátodo para la reacción de reducción en la mayoría de los estudios que se han realizado de las P-MFC. Es el aceptor de electrones más sostenible por su disponibilidad inagotable. Los biocatalizadores, que comprenden bacterias desarrolladas en la superficie del cátodo, disminuyen la concentración crítica de oxígeno de 5.5-6.6 a 0.1 mg L⁻¹ y mejoran la afinidad del oxígeno para el cátodo (Schröder, 2012). En la sección 1.4 del capítulo 1 se presentaron los tipos de materiales de configuración de las P-MFC para alcanzar un rendimiento significativo de producción de bioelectricidad.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Construcción y operación del reactor P-MFC

Se fabricaron dos reactores individuales, es decir, (i) P-MFC y (ii) C-MFC utilizando una membrana de maceta de arcilla (3 mm de espesor); altura de 20 cm y diámetro de 9 cm (0.0693 m²) (Figura 2.2A). Para el electrodo del ánodo (Figura 2.2B) se utilizó 648 cm² de fieltro de grafito (ESGRAF, S.A de C.V., México) de 6 mm de diámetro,

colocados alrededor de toda la superficie de la maceta. El fieltro de grafito se reportó anteriormente como un potencial material de ánodo (Kuleshova *et al.*, 2021). Como electrodo catódico, se utilizaron 270 cm² de malla de acero inoxidable (NYLOMAQ SL PLATE 9.5 mm 610 X 610 mm) que fue colocado dentro de la maceta de arcilla. Posteriormente, la P-MFC se incrustó con *S. rebaudiana*, como se muestra en la Figura 2.2C. El sistema de electrodos de P-MFC se instaló manualmente y se colocó a una profundidad entre 20-30 cm en el suelo. El experimento se realizó en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, durante 15 días. Durante este período, los reactores P-MFC y C-MFC fueron regados cada dos días con 2L de agua del grifo. El apéndice 2 muestra el proceso de configuración de la P-MFC basada en *Stevia rebaudiana*.

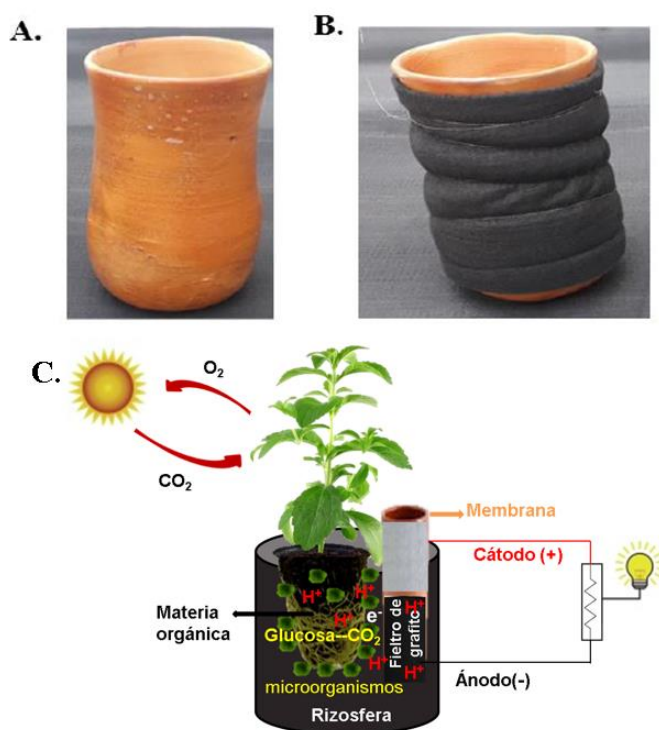


Figura 2.2. (A) Membrana de maceta de arcilla, (B) electrodo construido y (C) ilustración esquemática de la P-MFC evaluada en este estudio.

2.3.2. Diseño e implementación del sistema de adquisición de datos

De acuerdo con Maldonado-Ruelas *et al.* (2018) la adquisición de voltaje de los BES como las P-MFC es generalmente de muy baja potencia con alta impedancia eléctrica. Para resolver ese problema, es necesario realizar esquemas capaces de acoplar las impedancias de los sistemas P-MFC. Uno de los esquemas que se debe implementar es el sistema de adquisición de datos automáticos, el cual permite monitorear los voltajes mediante un sistema de plataforma digital (Arulmani *et al.*, 2021; Zhang *et al.* 2021; Attia *et al.*, 2022). El sistema de adquisición de voltaje utilizado en este estudio fue dividido en 6 pasos o etapas (Figura 2.3). Adicionalmente, el sistema fue compuesto por la interfaz ATMEGA2560 (Figura 2.4), el cual fue conectado a una computadora personal. Una de las características importantes de este Arduino, es la cantidad de puertos analógicos que tiene; además de que es muy sencillo de manejar (Maldonado-Ruelas *et al.*, 2018). Este sistema comprendió 32 canales y 16 salidas analógicas (Figura 2.5a). Previo al monitoreo de los datos, la plataforma digital fue calibrada con el objetivo principal de obtener datos precisos. La Figura 2.5b muestra la toma de datos en tiempo real. En la pantalla se observan dos ventanas abiertas. La ventana de la izquierda muestra el código de programación del Arduino y la ventana de la derecha indica el programa que guarda los datos generando un archivo .txt. (para más detalles véase el apéndice 1).

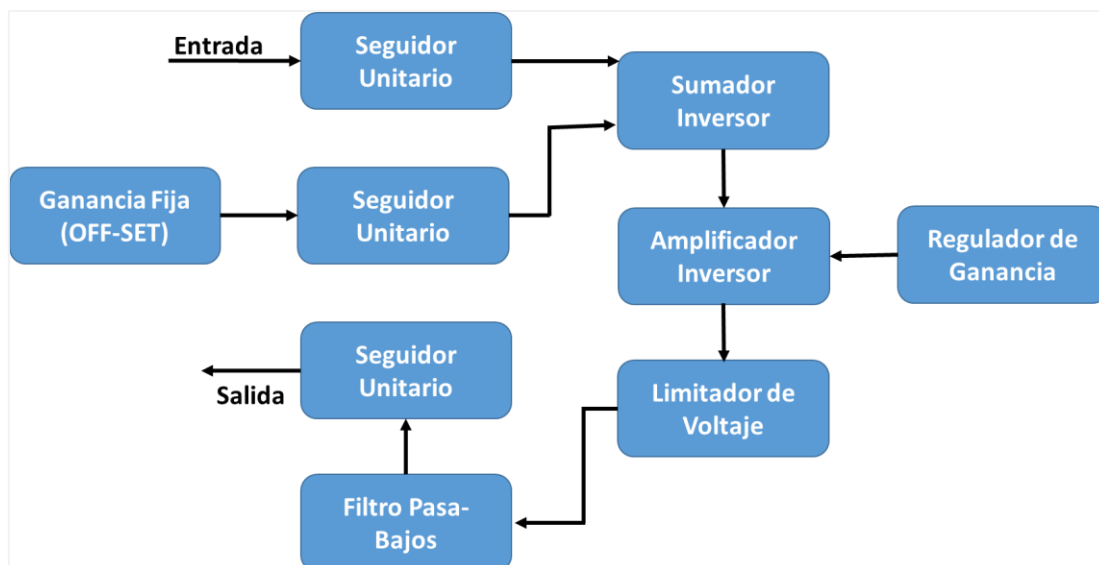


Figura 2.3 Presentación esquemática general del sistema de adquisición de datos automáticos de voltaje de las P-MFC (adaptado de Maldonado-Ruelas *et al.*, 2018).

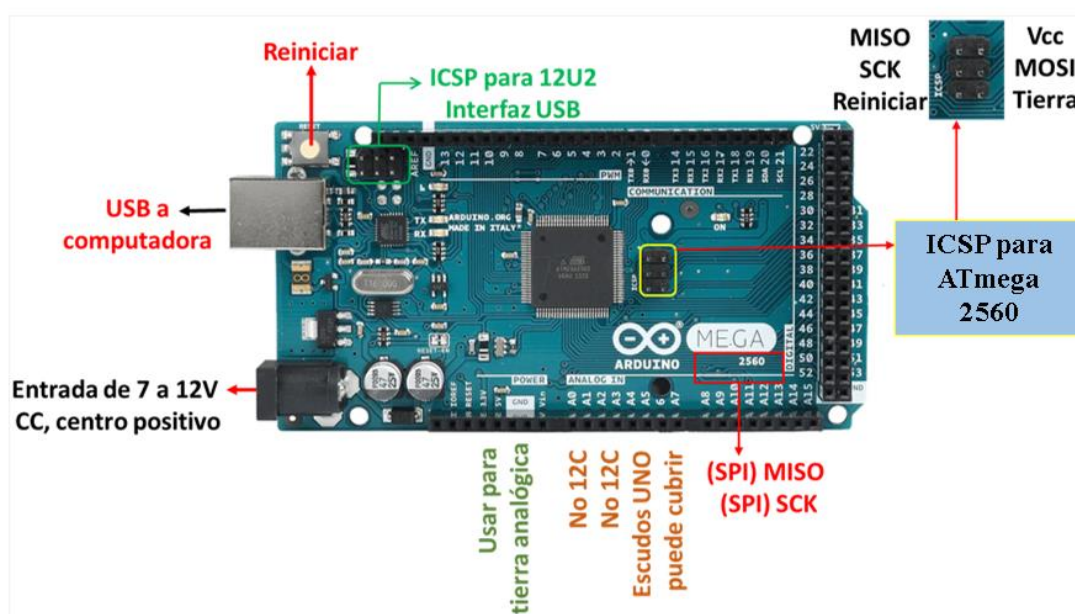


Figura 2.4. Características del microcontrolador Arduino, utilizado para el monitoreo de los datos de voltaje.

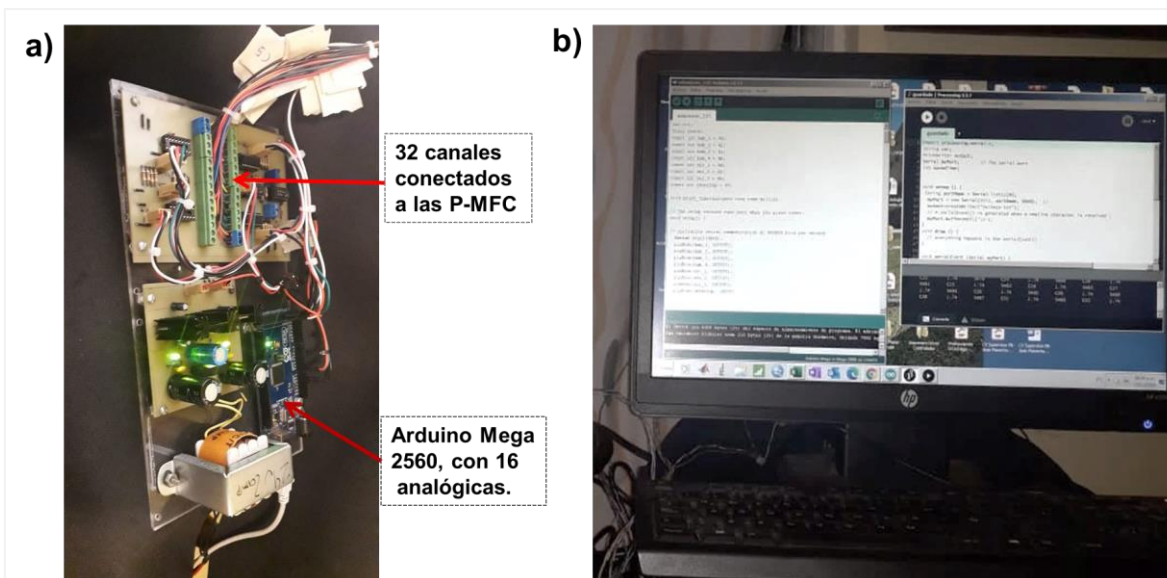


Figura 2.5. (a) Monitoreo de datos de voltaje mediante Arduino Mega 2560 y **(b)** una computadora personal registrando los datos.

Para el monitoreo de la humedad del suelo se utilizó un Arduino UNO (Figura 2.6), el cual fue conectado también a una computadora. Se utilizaron sensores de humedad (Sensor Capacitivo Anticorrosivo Arduino, KZRU25884, China) los cuales fueron conectados a los pines analógicos del Arduino.

Finalmente, los datos de voltaje obtenidos del sistema de adquisición fueron guardados de manera automática mediante la plataforma Processing (versión 3.4) acoplado a la interfaz (véase el apéndice 1.4). Los datos se actualizaron generando un archivo “.txt” con la información exacta y acomodada para su posterior análisis. Esto permitió evitar pérdida de datos cuando hubiera un corto circuito u otros problemas con el sistema. Para los datos de humedad del suelo se utilizó el programa PLX DAQ (archivo Excel).

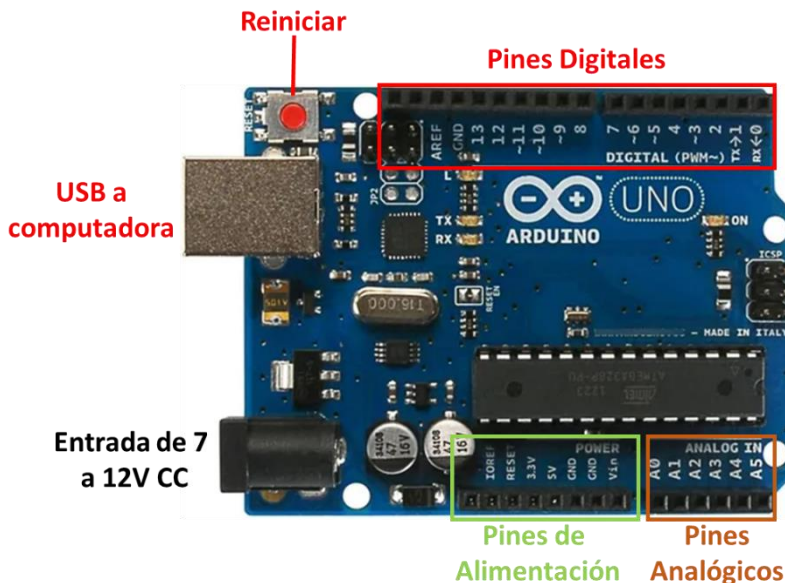


Figura 2.6. Esquema del Arduino UNO utilizado en este estudio.

2.3.3. Mediciones de bioelectricidad

El voltaje de circuito abierto (OCV, por sus siglas en inglés) se registró (en tiempo real) en un intervalo de tiempo de 15 min/dato, utilizando el sistema de adquisición de datos construido, durante 15 días. Luego, en la etapa final del experimento, se aplicaron manualmente 11 resistencias externas (entre los rangos de 100Ω a 1000Ω) en 10 min de polarización (Rusyn y Hamkalo, 2020). La corriente y la potencia se calcularon utilizando la ley de Ohm (Apollon *et al.*, 2022a). Las densidades de corriente y potencia se calcularon considerando el área (0.0693 m^2) de la superficie anódica del reactor P-MFC. La Ecuación (2.3) indica la ley de Ohm, y las Ecuaciones (2.4) – (2.5) muestran el proceso de cálculo de la bioelectricidad de acuerdo con la ley de ohm (Nasrabadi y Moghimi, 2022). Finalmente, la Ecuación (2.6) muestra el proceso de cálculo de la densidad de corriente, según el área proyectada de la superficie del ánodo (Rusyn *et al.*, 2021; Apollon *et al.*, 2020).

- Voltaje (V): $V = I * R$ (2.3)

- Intensidad de corriente (A): $I = \frac{V}{R_{ext}}$ (2.4)

- Potencia (W): $P = V * I$ (2.5)

- Densidad de corriente : $I = \frac{V}{A_{\text{ánodo}} R_{ext}}$ (2.6)

Donde:

V: Voltaje (Volts).

I: Intensidad (A).

R_{ext} : Resistencia externa (Ω).

$A_{\text{ánodo}}$: Área proyectada de la superficie del ánodo.

V_{oc} : Voltaje de circuito abierto (Volts).

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Desempeño de los reactores en OCV

Los resultados presentados en la Figura 2.7 muestran que los dos reactores evaluados en este estudio tuvieron un comportamiento diferente para los parámetros de OCV. La P-MFC resultó ser un reactor más efectivo en este estudio, alcanzando un OCV mayor con un valor de 850 mV (0.85 V), mientras que C-MFC indicó un OCV de 762 mV (0.772 V). Este comportamiento se debe a que hubo mayor actividad bacteriana en la superficie del ánodo de la P-MFC en comparación con la de MFC (Apollon *et al.*,

2022a); aunque, los reactores compartían el mismo tipo de membrana. Por ejemplo, cuando la planta realiza el proceso de fotosíntesis, esto permite que una gran cantidad de exudados o compuestos orgánicos estén presentes en el compartimiento del ánodo (Strik *et al.*, 2008). Los resultados antes mencionados estuvieron en los rangos reportados por Kumar *et al.* (2018) usando una P-MFC (DcPMFC) de doble cámara que se configuró con una cámara de cátodo interna y un conjunto de electrodo de cátodo de aire con separador de terracota externo. Sin embargo, en otro estudio realizado por Kumar *et al.* (2020), se encontraron rendimientos de voltaje de 292.1 mV (0.2991 V) y 321.7 mV (0.3217 V), en dos tipos de reactores: Tipo-I (horizontal) y Tipo-II (vertical) de P-MFC cerámica a base de terracota (C-PMFC), respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los alcanzados en el presente estudio. Además, un estudio realizado por Syed *et al.* (2021) mostró un OCV de 650 mV (0.65 V), utilizando estiércol de ganado como sustrato (estiércol de bovino y estiércol de búfalo) para incrementar la generación de energía en los reactores MFC. Dicho resultado también fue inferior comparando con lo reportado en este estudio. En un estudio realizado por Apollon *et al.* (2020), se logró un OCV máximo de 1200 mV (1.2 V) en una novedosa P-MFC basada en una barra de cerámica (colocada verticalmente) operada con dos especies de *Opuntia* (*O. ficus-indica* y *O. joconostle*). Durante el experimento, las P-MFC se regaron con 1 L de agua/semana, durante 30 días; mientras que en el presente estudio las plantas fueron regadas con 2 L de agua cada dos días, durante 15 días. Anteriormente, el voltaje máximo de 1454.1 mV (1.4541 V) fue encontrado en una P-MFC operada con suelo como sustrato (Rusyn *et al.*, 2019). Estos resultados son superiores a los encontrados en este trabajo. Por lo tanto, se puede argumentar que el sistema utilizado en este estudio puede impulsar la tecnología P-MFC en

condiciones de saturación. Además, el sistema de adquisición de datos desarrollado fue adecuado para monitorear datos de voltaje en tiempo real.

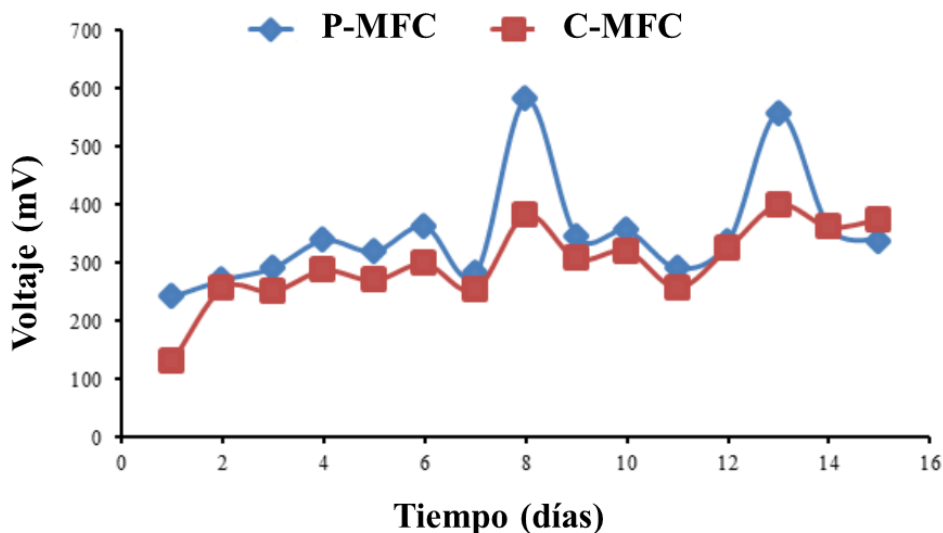


Figura 2.7. Rendimiento de salida de voltaje en los dos reactores durante 15 días.

2.4.2. Experimento de polarización

La polarización se realizó al final del estudio. Los resultados indicaron un comportamiento diferente entre ambos reactores, que compartían un compartimento anódico similar (Figura 2.8A). El voltaje máximo de 600 mV (0.6 V) se obtuvo en el reactor P-MFC, en comparación con el reactor C-MFC que indicó un voltaje de 448 mV (0.448 V), con una resistencia de 1000 Ω . El P-MFC mostró mayor eficiencia energética de 186 mA m⁻², siendo el mejor reactor en este estudio. Posteriormente, exhibió una densidad de potencia máxima de 66 mW m⁻² (Figura 2.8B), la cual fue superior (86.21% y 74.54%) a la densidad de potencia reportada por Kumar *et al.* (2020).

Además, otros estudios indicaron densidades de potencia inferiores a la alcanzada en este estudio (Sudirjo *et al.*, 2019b; Syed *et al.*, 2021; Apollon *et al.*, 2022a). Sin embargo, en un estudio reciente, se reportaron densidades de potencia más altas de 1613.3 ± 155.5 (sistema con cinco ramas) y 1185.1 ± 29.1 mW m⁻² (sistema con una rama colectora), respectivamente, en sistemas electroquímicos microbianos (MES, por sus siglas en inglés) optimizando el colector de ánodos (Li *et al.*, 2022). Por lo tanto, estos investigadores encontraron una estrategia efectiva integrando un colector de corriente de metal en el electrodo del ánodo para reducir la pérdida de potencia del sistema; y estos resultados fueron superiores a los encontrados en los dos reactores evaluados. Esta diferencia se debe a los tipos de sistemas utilizados en ambos estudios, así como al tiempo de operación de estos.

Por otro lado, es importante buscar alternativas para mejorar la tecnología P-MFC. Por ejemplo, para aumentar el rendimiento o la eficiencia de los sistemas P-MFC, es necesario aplicar tratamientos adecuados. El tratamiento implica agregar un catalizador al electrodo para facilitar la transferencia de electrones de las bacterias a las superficies del ánodo y el cátodo a los aceptores, así como la alteración estructural de las superficies del ánodo y el cátodo para acomodar más bacterias para el transporte de electrones. El oxígeno (O₂) es el aceptor de electrones más utilizado como cátodo para la reacción de reducción en la mayoría de los estudios de P-MFC. Es el aceptor de electrones más sostenible debido a su disponibilidad inagotable. Los biocatalizadores, que comprenden bacterias que crecen en la superficie del cátodo, reducen la concentración crítica de oxígeno de 5.5–6.6 a 0.1 mg L⁻¹ y mejoran la afinidad del oxígeno por el cátodo (Schröder, 2012). Por lo tanto, las plantas juegan un

papel decisivo en la producción de O_2 , aumentando el rendimiento de las P-MFC. Además, la medición del voltaje en tiempo real en la P-MFC permite conocer con exactitud su eficiencia. Por lo anterior, se puede argüir que la implementación de un sistema de adquisición de datos de voltaje en tiempo real en BES, permite ahorrar más tiempo y también obtener datos reales de los sistemas. Finalmente, es inevitable extender el uso de las P-MFC a gran escala en el futuro.

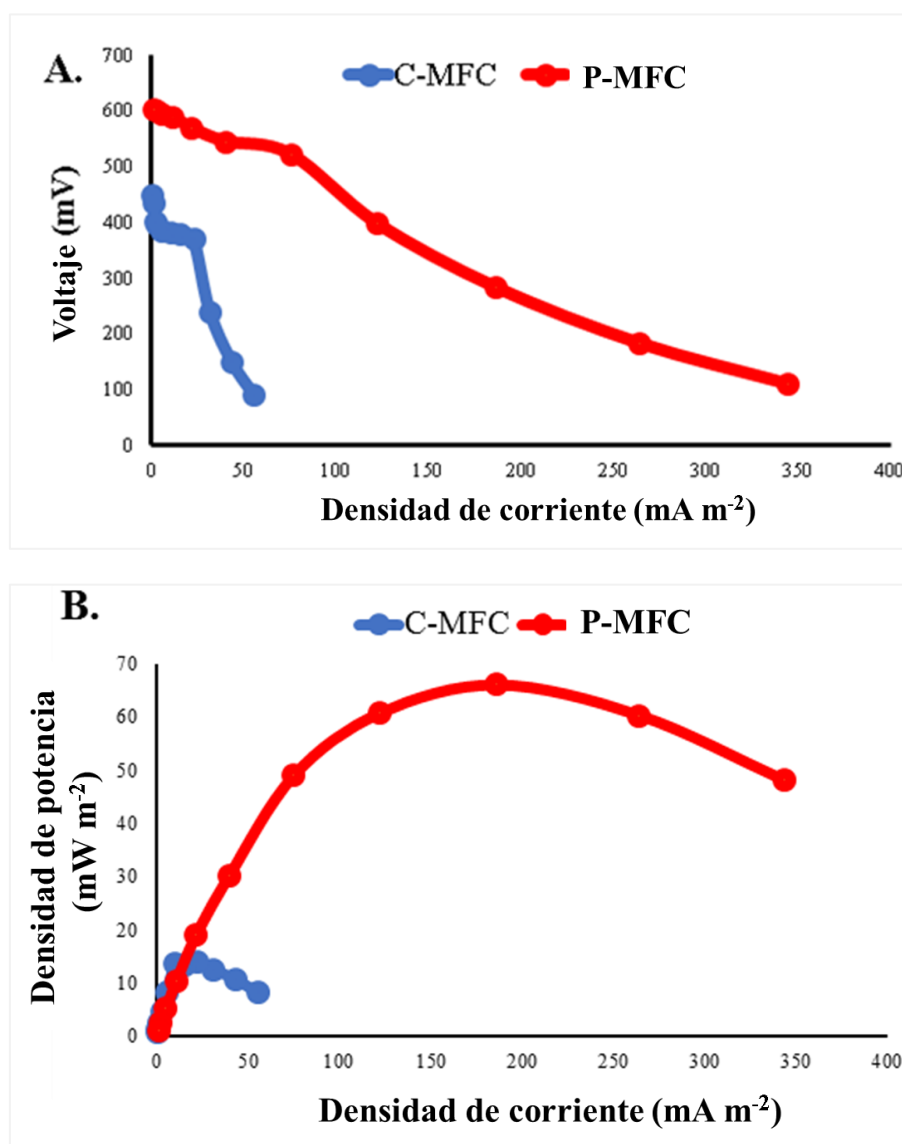


Figura 2.8. (A) Curva de polarización y (B) curva de densidad de potencia de P-MFC y C-MFC en la etapa final del estudio.

2.5. Conclusiones

En este estudio se evaluó el desempeño de un sistema automático de adquisición de datos de voltaje para P-MFC. Este sistema permitía obtener datos en tiempo real y prolongado. El uso de este sistema tiene ventajas por la cantidad de canales, su costo-beneficio y su fácil manejo. Además, la membrana de maceta de arcilla utilizada para el diseño del reactor hizo posible producir bioelectricidad a bajo costo. El voltaje máximo alcanzado con la P-MFC fue de 850 mV (0.85 V), mientras que C-MFC alcanzó un voltaje máximo de 762 mV (0.772 V). Además, el mismo reactor logró una generación de potencia máxima de 66 mW m^{-2} en 10 min de polarización, mientras que una densidad de potencia con la C-MFC fue igual a 13.64 mW m^{-2} . *S. rebaudiana* mostró una gran alternativa para la generación de energía. Además, el sistema de adquisición de monitoreo fue adecuado para la obtención de datos en tiempo real. Finalmente, se necesitan tecnologías alternativas de producción de electricidad como P-MFC para satisfacer la futura demanda de electricidad.

Referencias

- Angelini, L.G., Ceccarini, L., Nassi o Di Nasso, N., & Bonari, E. (2008). Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass Bioenergy*, 33(4), 635–643.
- Apollon, W., Kamaraj, S. K., Silos-Espino, H., et al. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: Demonstration of their applications. *Appl Energy*, 279, 115788.
- Apollon, W., Luna-Maldonado, A. I., Kamaraj, S. K., et al. (2021). Progress and recent trends in photosynthetic assisted microbial fuel cells: A review. *Biomass Bioenergy*, 148, 106028.
- Apollon, W., Valera-Montero, L. L., Perales-Segovia, C., et al. (2022a). Effect of ammonium nitrate on novel cactus pear genotypes aided by biobattery in a semi-arid ecosystem. *Sustain. Energy Technol. Assess*, 49, 101730.
- Apollon, W., Rusyn, I., González-Gamboa, N., J. A. et al. (2022b). Improvement of zero waste sustainable recovery using microbial energy generation systems: A comprehensive review. *Sci Total Environ*, 817, 153055.
- Arulmani, S. R. B., Gnanamuthu, H. L., Kandasamy, S., et al. (2021). Sustainable bioelectricity production from *Amaranthus viridis* and *Triticum aestivum* mediated plant microbial fuel cells with efficient electrogenic bacteria selections. *Process Biochem*, 107, 27–37.
- Attia, Y.A., Samer, M., Mohamed, M.S.M., et al. (2022). Nanocoating of microbial fuel cell electrodes for enhancing bioelectricity generation from wastewater. *Biomass Convers.* <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02321-7>
- Baeza, J. A., Martínez-Miró, A., Guerrero, J., Ruiz, Y. & Guisasola, A. (2017). Bioelectrochemical hydrogen production from urban wastewater on a pilot scale. *J. Power Sources*, 356, 500–509.

- Choudhury, P., Ray, R. N., Bandyopadhyay, T. K., et al. (2021). Process engineering for stable power recovery from dairy wastewater using microbial fuel cell. *Int. J. Hydrog. Energy*, *46*(4), 3171–3182.
- Cotterill, S. E., Dolfing, J., Jones, C., Curtis, T. P. & Heidrich, E. S. (2017). Low temperature domestic wastewater treatment in a microbial electrolysis cell with 1 m² anodes: Towards system scale-up. *Fuel Cells*, *17*, 584–592.
- Helder, M., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., et al. (2010). Concurrent bioelectricity and biomass production in three Plant-Microbial Fuel Cells using *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* and *Arundo donax*. *Bioresour Technol*, *101*, 3541–3547.
- Kuleshova, T. E., Gall', N. R., Galushko, A. S., & Panova, G. G. (2021). Electrogenesis in plant–microbial fuel cells in parallel and series Connections. *Tech. Phys.*, *66*, 496–504.
- Kumar, V.K., Man mohan, K., Manangath, S.P., & Gajalakshmi, S. (2018). Terracotta Separator based Plant Microbial Fuel Cell for Bioelectricity and Catholyte Production. *Int. J. Appl. Eng. Res.*, *13*, 14948-14955.
- Kumar, V.K., Man mohan, K., Sreelakshmi, P.M., Manju, P., & Gajalakshmi, S. (2020). Resource recovery from paddy field using plant microbial fuel cell. *Process Biochem*, *99*, 270–281.
- Lam, S. M., Sin, J. C., Zeng, H., et al. (2022). Ameliorating Cu²⁺ reduction in microbial fuel cell with Z-scheme BiFeO₃ decorated on flower-like ZnO composite photocathode. *Chemosphere*, *287*, 132384.
- Li, J., Liu, G., Chen, D., et al. (2022). Enhanced microbial electrochemical systems performance by optimizing the “anode-collector” collection mode: from enhancement mechanism to construction atrategy. *ACS ES&T Engineering*, *2*, 263–270.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., et al. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environ. Sci. Technol*, *40*(17), 5181–5192.

- Luo, F.L. (2009). Personal Communication. Research Center Jülich, ICG-3, Jülich, Germany.
- Maddalwara, S., Nayaka, K.N., Kumar, M., & Singh, L. (2021). Plant microbial fuel cell: Opportunities, challenges, and prospects. *Bioresour Technol*, 341, 125772.
- Maldonado-Ruelas, V.A., Ortiz–Medina, R.A., Apollon, W., & Silos-Espino, H. (2018). Design and implementation of a voltage acquisition system for nopal-based fuel cells. *Revista de Energías Renovables*, 2(7), 19–25.
- Moqsud, M. A., Yoshitake, J., Bushra, Q. S., et al. (2015). Compost in plant microbial fuel cell for bioelectricity generation. *Waste management*, 36, 63-69.
- Nasrabadi, A. M., & Moghimi, M. (2022). Energy analysis and optimization of a biosensor-based microfluidic microbial fuel cell using both genetic algorithm and neural network PSO. *Int. J. Hydrog. Energy*, 47(7), 4854–4867.
- Prabha, J., Kumar, M., & Tripathi, R. (2021). Opportunities and challenges of utilizing energy crops in phytoremediation of environmental pollutants: A review. In V. Kumar, G. Saxena, M. P. Shah (Eds.), *Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 383–396). Elsevier.
- Rabaey, K., Rodríguez, J., Blackall, L. L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., Verstraete, W. & Nealsen, K. H. (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities. *The ISME Journal*, 1, 9–8.
- Ramadan, B. S., Hidayat, S., & Iqbal, R. (2017). Plant microbial fuel cells (PMFC): green technolog for achieving sustainable water and energy. In *Proceedings book of the 7th basic science international conference basics science for improving survival and quality of life; mar 7-8; malang, Indonesia*. p. 82-85.
- Rusyn, I. B., & Hamkalo, Kh. R. (2020). Electro-biosystems with Mosses on Green Roofs. *Environ. Res. Eng. Manag.*, 76(1), 20-31.

- Rusyn, I. B., Vakuliuk, V. V., & Burian, O. V. (2019). Prospects of use of *Caltha palustris* in soil plant-microbial eco-electrical biotechnology. *Regul. mech. biosyst.*, *10*(2), 233-238.
- Rusyn, R. (2021). Role of microbial community and plant species in performance of plant microbial fuel cells. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, *152*, 111697.
- Rusyn, I.B., Medvediev, O.V., & Valko, B.T. (2021). Enhancement of bioelectric parameters of multi-electrode plant–microbial fuel cells by combining of serial and parallel connection. *Int J Environ Sci Technol*, *18*, 1323–1334.
- Sabin, J. M., Leverenz, H., & Bischel, H. N. (2022). Microbial fuel cell treatment energy-offset for fertilizer production from human urine. *Chemosphere*, *294*, 133594.
- Saeed, T., Majed, N., Kumar Yadav, A., Hasan, A., & Jihad Miah, M. (2022). Constructed wetlands for drained wastewater treatment and sludge stabilization: Role of plants, microbial fuel cell and earthworm assistance. *Chem Eng Technol*, *430*, 132907.
- Schröder, U. (2012). Cover Picture: Microbial Fuel Cells and Microbial Electrochemistry: *ChemSusChem*, *5*, 957.
- Sekar, N., & Ramasamy, R. P. (2015). Recent advances in photosynthetic energy conversion. *J Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, *22*, 19–33.
- Sharma, P., Talekar, G. V., & Mutnuri, S. (2021). Demonstration of energy and nutrient recovery from urine by field-scale microbial fuel cell system. *Process Biochem*, *101*, 89–98.
- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Snel, J.F.H., & Buisman, C.J.N. (2008). Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.*, *32*, 870–876.
- Sudirjo, E., Buisman, C.J.N., & Strik, D.P.B.T.B. (2019a). Activated Carbon Mixed with Marine Sediment is Suitable as Bioanode Material for *Spartina anglica*

Sediment/Plant Microbial Fuel Cell: Plant Growth, Electricity Generation, and Spatial Microbial Community Diversity. *Water*, 11(9), 1810.

Sudirjo, E., Pim de Jager, Buisman, C. J. N., & Strik, D.P.B.T.B. (2019b). Performance and Long-Distance Data Acquisition via LoRa Technology of a Tubular Plant Microbial Fuel Cell Located in a Paddy Field in West Kalimantan, Indonesia. *Sensor*, 19, 46–47.

Syed, Z., Sonu, K., & Sogani, M. (2021). Cattle manure management using microbial fuel cells for green energy generation. *Biofuel Bioprod Biorefin*, 16(2), 460-470.

Wang, Xu, D., Zhang, Q., Liu, T., & Tao, Z. (2022). Simultaneous removal of heavy metals and bioelectricity generation in microbial fuel cell coupled with constructed wetland: an optimization study on substrate and plant types. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 29, 768–778.

Wetser, K., Sudirjo, E., Buisman, C. J. N., & Strik, D. P. B. T. B. (2015). Electricity generation by a plant microbial fuel cell with an integrated oxygen reducing biocathode. *Appl Energy*, 137, 151–157.

Zhang, K., Wu, X., Wang, W., et al. (2021). Effects of plant location on methane emission, bioelectricity generation, pollutant removal and related biological processes in microbial fuel cell constructed wetland. *J. Water Process. Eng*, 43, 102283.

CAPÍTULO 3. REUTILIZACIÓN AUTOSOSTENIBLE DE NUTRIENTES ASOCIADA A LA GENERACIÓN DE ELECTRICIDAD A PARTIR DE NUEVAS CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANA BASADA EN PLANTA

3.1. Introducción

La recuperación de nutrientes como el nitrógeno (N), el fósforo (P) y potasio (K) en diferentes tipos de desperdicios (por Ej., aguas residuales domésticas, orina humana, etc.), ha sido objeto de numerosas investigaciones durante décadas. Estos tres macronutrientes son elementos esenciales que requieren las plantas para completar su ciclo de vida. La recuperación de estos elementos en grandes cantidades permitiría que pudieran aprovecharse para suplir la demanda alimentaria de la población mundial. En las aguas residuales domésticas, las concentraciones de N y P son generalmente bajas (Liu *et al.*, 2008); así como también el proceso de recuperación de los nutrientes requiere alto consumo de energía. Actualmente, las tecnologías de tratamiento aplicadas tienen como propósito eliminar en gran parte las concentraciones de N o P con muy poca recuperación. Se sabe que la mayor recuperación de N está cubierta por el método de Haber-Bosch, mediante el cual se utiliza energía fósil para la fijación de N atmosférico en la molécula amoniacal que posteriormente se utiliza como fertilizante. Este método en si tiene efecto negativo

sobre el medio ambiente, ya que contribuye de manera importante a la liberación de gases a efecto de invernadero, aparte de representar aproximadamente el 2 % del consumo de energía global (Kugler *et al.*, 2014).

La orina humana tiene alta concentración de urea, cloruro de sodio (NaCl), potasio y fosfato, etc. (Larsen y Gujer, 1996). Además, se sabe que ocupa aproximadamente un volumen de 1 % de la cantidad de las aguas residuales municipales, sin embargo, representa el 80 % de N, 50 % de P y 90 % de K (Larsen *et al.*, 2001); así como también el 10 % de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Larsen y Gujer, 1996), en las aguas residuales municipales. La recuperación o remoción de nutrientes (N y P) en aguas residuales a través de instalaciones de eliminación de nutrientes biológicos, consume mucha energía (Wilsenach y van Loosdrecht, 2004). Asimismo, la separación de la fuente de orina podría no solo mejorar la calidad de los efluentes, sino también reducir el consumo de energía; así como también el costo de instalación de las plantas de tratamiento de aguas residuales receptoras (WWTP, por sus siglas en inglés) (Wilsenach y van Loosdrecht, 2004).

Los BES han surgido como una tecnología prometedora para responder a la alta demanda de consumo energético mundial. Las MFC se derivan de los BES que se han diseñado para diferentes aplicaciones. Estos comprenden (i) tratamiento de aguas residuales, (ii) producción de biocombustible, (iii) sedimentos contaminados y (iv) biosensores. El principal objetivo de las MFC es transformar la energía química liberada por la materia orgánica (MO) directamente a electricidad mediante la actividad metabólica de las EAB (Domínguez-Garay y Esteve-Núñez, 2018). Existen otras aplicaciones en las que se podrían implementar estos sistemas bioelectroquímicos

(Ieropoulos *et al.*, 2017), tales como las que desarrollan sistemas de MFC inoculadas que emplean como única fuente de materia prima la orina humana (Ieropoulos, 2012), utilizados para cargar la batería de teléfonos inteligentes (Ieropoulos *et al.*, 2017; Walter *et al.*, 2016); así como encender luces en los inodoros (Walter *et al.*, 2018). La orina humana constituye una concentrada fuente de nutrientes (e.g., N, P, K); y su pH oscila entre 5.6–6.8 (Fittschen y Hahn, 1998).

En estudio previo se encontró la tasa de recuperación de nitrógeno amoniacal (NH_4^+ -N) y ortofosfato (PO_4^{3-} -P) de 94.6 % y de 28.6 %, respectivamente alcanzado con una densidad de potencia volumétrica de 2.6 W m^{-3} ; en una MFC inoculada con orina (Zang *et al.*, 2012). Sharma *et al.* (2021) reportaron una eficiencia de recuperación de NH_4^+ -N y PO_4^{3-} -P de 46 ± 2.16 % y 90 ± 1.5 % respectivamente en orina usada en un sistema de MFC a escala de campo acompañado de una salida de densidad de potencia máxima de 14.5 mW m^{-2} . Para la operación a largo plazo (80 días), se logró una potencia promedio de 1.05 mW por una cascada-MFC inoculada con orina (Obata *et al.*, 2020). Además, se ha reportado una salida de potencia máxima de $29.64 \pm 2.3 \text{ mW m}^{-2}$ durante 30 días de operación de una MFC alimentada con orina (Salar-García *et al.*, 2020). Sin embargo, los trabajos de literatura mencionados anteriormente no abordaron la reutilización directa sostenible de nutrientes junto con el crecimiento de las plantas para una agricultura integrada inteligente con electricidad verde.

Además, las P-MFC se han diseñado para producir bioelectricidad de forma continua y también para mejorar la eficiencia del sistema. La P-MFC es un nuevo sistema sostenible y renovable también derivado de BES a través del cual la energía acumulada por la planta (i.e., energía química) durante el proceso de fotosíntesis se

convierte en bioelectricidad. Al igual que las MFC, las P-MFC también se aplicaron para alimentar los siguientes dispositivos: LED y reloj digital (Apollon *et al.*, 2020), Internet de las Cosas (IoT, por sus siglas en inglés) (Osorio de la Rosa *et al.*, 2019) y biosensores (Sudirjo *et al.*, 2019). Sin embargo, las P-MFC también enfrentan grandes desafíos con respecto a la generación de energía en el funcionamiento a largo plazo y su aplicación a gran escala en tiempo real. Apollon *et al.* (2021) discutieron los avances y tendencias más recientes en termino de configuraciones de los P-MFC, los tipos de materiales de membrana, ánodo y cátodo utilizados; los factores que afectan el rendimiento de las tecnologías de P-MFC, los desafíos enfrentados por estos sistemas bioelectroquímicos y sus posibles aplicaciones en tiempo real.

Por otra parte, La Evaluación del Ciclo de Vida (LCA, por sus siglas en inglés) al comienzo del uso de BES es crucial para guiar estas tecnologías hacia el desarrollo sostenible. Los impactos ambientales (es decir, más del 70%) que pueden ser causados por el uso de un sistema deben ser evaluados tanto durante su proceso de configuración, así como también durante su operación (Rebitzer, 2002). Desde hace varias décadas la LCA ha sido utilizada para la estimación de las cargas ambientales de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Dennison *et al.*, 1998). La LCA evalúa los cambios en las prácticas de tratamiento de aguas residuales, proponiendo diferentes soluciones técnicas con relación a las cargas ambientales estimadas que exigen las emisiones y también el uso de recursos (Lundin *et al.*, 2000). En otros estudios autores han utilizado la metodología de LCA para examinar los impactos ambientales del uso de los MFC (Zhang *et al.*, 2018, 2019a, 2019b).

La alimentación de nutrientes *In situ* sostenible en P-MFC es atractiva, sin embargo, aún no se ha informado. La agricultura integrada inteligente y sostenible es otro aspecto muy importante para abordar en la actualidad. El uso de la P-MFC en la agricultura ayuda a reducir los gases de efecto invernadero. Esta tecnología permite la producción de alimentos saludables y también responde a la alta demanda mundial de alimentos. La orina es una fuente muy importante de urea y su uso en la P-MFC se ha limitado a estudiar. La aplicación de orina de animales domésticos en el P-MFC permite la generación de fertilizantes de muy bajo costo y además reduce los impactos ambientales. Además, la tecnología P-MFC se puede operar (implementar) en cualquier campo de producción de cultivos sin competir o dañar las plantas.

En este capítulo, se desarrolló de manera sostenible la fácil autoalimentación de la reutilización de desechos de orina de animales domésticos asociados con la generación de energía mejorada, en una P-MFC (cantarito o taza de arcilla) embebida con *Stevia rebaudiana*. Los objetivos de este estudio fueron: (i) estimar la cantidad de N, P y K reutilizados por el sistema P-MFC inoculado con orina de tres especies de animales domésticos; y (ii) evaluar la producción de bioelectricidad de las P-MFC utilizando *Stevia rebaudiana*. Finalmente, se evaluó el impacto del sistema P-MFC en el medio ambiente. Esto incluye varios aspectos como la LCA y la relación costo-beneficio; por ejemplo, los costos de los materiales de instalación para una P-MFC.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Ubicación de estudio

Este trabajo de investigación se llevó a cabo a la intemperie en el Municipio de General Escobedo, N.L., con ubicación geográfica 25° 78' 02" Latitud Norte y 100° 18' 58" Longitud Oeste; Altitud de 500 msnm (metro sobre el nivel del mar); una precipitación anual de 300-600 mm; y una temperatura media anual entre 18 y 24°C (INEGI, 2017).

3.2.2. Recolección de muestras de orina

Se recolectó orina de diferentes especies de animales domésticos sanos (bovino, caprino y ovino) en la Unidad Académica Marín de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FA-UANL). Se seleccionaron cuatro animales para recolectar la orina de cada especie. Posteriormente, las muestras se conservaron en un área con una temperatura de 4 °C y se aplicaron a los tres días de su recolección. El pH de la orina fresca estaba entre 6 y 6.8.

3.2.3. Operación e inoculación de los reactores P-MFC

El experimento se llevó a cabo en campo abierto, donde se evaluaron cuatro P-MFC, bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones (Figura 3.1); de un total de 20 P-MFC (unidades experimentales, UE). La unidad experimental fue una maceta de 7.25 L + una P-MFC instalada, la cual fue llenada por un sustrato proveniente de un

vivero de Atlacomulco, ciudad de México. Este sustrato fue elegido por su alto contenido de materia orgánica (MO). Para el material vegetal, se usaron plantas de *Stevia rebaudiana* provenientes del mismo vivero de Atlacomulco.

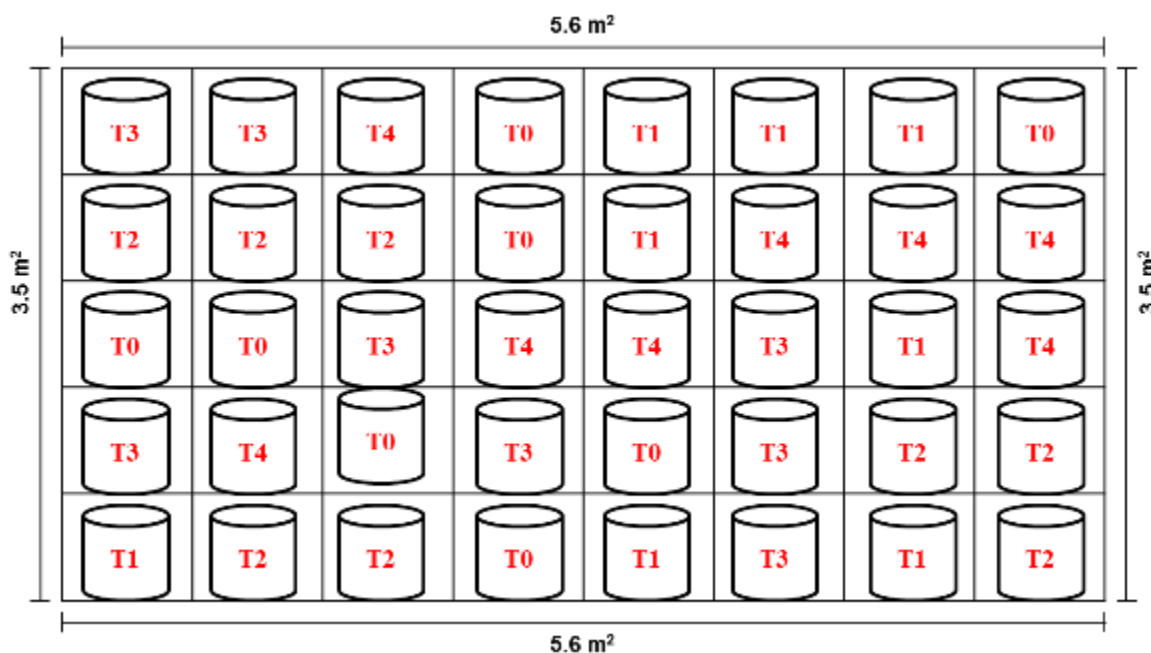


Figura 3.1. Croquis del experimento. Distancia entre UE: 0.70 m²; Área total: 19.6 m².

El modelo estadístico que se utilizó para este experimento fue (Ec. 3.1):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + (TD)_{ij} + E_{ij} \quad (3.1)$$

Dónde:

Y_{ij} = variable de respuesta.

μ = Media general.

T_i = efecto del i-ésimo tratamiento.

D_j = efecto del j-ésimo dosis de 1 L de orina del ganado.

$(TD)_{ij}$ = efecto de i-ésimo y j-ésimo interacción de tratamientos y dosis.

E_{ij} = j-ésimo efecto aleatorio ligado a i-ésimo UE o error experimental.

Por otro lado, los tratamientos evaluados fueron: (a) P-MFC-1* (testigo sin inocular), (b) P-MFC-2 + orina de bovino, (c) P-MFC-3 + orina de caprino y (d) P-MFC-4 + orina de ovino. Previa a la inoculación, las P-MFC fueron operadas durante 15 días hasta que se estabilizó el sistema. En este periodo se procedió a la irrigación de las plantas con 2 L de agua doméstica cada 2 días. Posteriormente, las P-MFC fueron inoculadas con una dosis de 642.86 mL de orina.

3.2.4. Análisis químico de las orinas

Se analizó la composición química inicial y final de los tres tipos de orina utilizados en este estudio. La Conductividad Eléctrica (CE) y el pH de las muestras se monitorizaron 72 horas desde la recolección y 120 horas después de la inoculación de las P-MFC utilizando dos electrodos selectivos (COMBO pH y Medidor de CE de la marca HM DIGITAL) con las siguientes características: pH-80 para medir el pH y AP-2 para medir la CE, respectivamente. Antes del experimento (i.e., un día antes), se determinó la composición química (análisis inicial) de cada tipo de orina (i.e., orina fresca). Además, se analizaron muestras de orina 43 días después de la inoculación de los reactores (análisis final). Se determinaron los siguientes parámetros: pH y CE; las concentraciones de NH_4^+-N y PO_4^{3-} se estimaron como se informó en otro lugar (Clesceri *et al.*, 1996). Mientras que las tasas de concentración de N, P y K se cuantificaron como se informó en otro lugar (Freguia *et al.*, 2019). Además, el carbono orgánico (CO) y la MO se determinaron mediante el método Walkley y Black.

Finalmente, las bases intercambiables (K, Ca, Na y Mg) se estimaron por el método del Acetato de Amonio 1N, pH 7.

3.2.5. Análisis fisicoquímico del sustrato

El análisis químico del sustrato se realizó en dos etapas del experimento: a) etapa inicial (antes de configurar el experimento) y b) etapa final (después de la aplicación de la orina) para la reutilización de nutrientes. El pH y la CE (extracto de saturación del sustrato) se determinaron mediante el método de 1 g L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$; el porcentaje de MO como se describe en otra parte (Dewis y Freitas, 1970); nitrato (NO_3^- -N) por la técnica de nitración con ácido salicílico (método colorimétrico) y ortofosfato (PO_4^{3-} -P) por la técnica espectrofotométrica. Mientras que la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se midió por absorción atómica (Slavin, 1978).

3.2.6. Adquisición y cálculos de datos de bioelectricidad

Al inicio de las pruebas, todas las P-MFC fueron operadas en circuito abierto (OC, por sus siglas en inglés) durante 30 días. El voltaje (V) fue monitoreado con un multímetro digital (STEREN, Modelo: MUL-282, China) todos los días a las 10 de la mañana. Posteriormente, se realizaron dos experimentos de polarización para seleccionar la densidad de potencia máxima de los reactores P-MFC, la cual se realizó como se describe en Logan y Regan (2006b). El primer experimento de polarización inició después de 15 días del arranque del sistema, considerándose la aplicación de diferentes tipos de resistencias externas. Previamente a la aplicación de los resistores (cargas), se tomaron los valores de las mismas con el multímetro para asegurarse de

sus rangos reales. Las cargas externas utilizadas en este estudio oscilaron en el rango de 100Ω a $20 \text{ K}\Omega$. Se usaron 11 cargas externas diferentes por duplicado para obtener el valor óptimo de la potencia de las P-MFC. Los resistores se cambiaron cada 5 min y se dejó un tiempo de equilibrio de 10 min entre cada medida. El segundo experimento de polarización fue realizado 72 h después de la aplicación de los tratamientos con orina de las diferentes especies de animales. Posteriormente, empleando la Ley de Ohm se calculó la corriente (I) en amperios (A) y la potencia (P) en watt (W). Los valores de densidades de corriente (mA m^{-2} / mA m^{-3}) y de potencia (mW m^{-2} / mW m^{-3}) se estandarizaron considerando el área de la superficie del ánodo (0.0693 m^2) y al volumen de la superficie del ánodo (0.0810 m^3), respectivamente.

De acuerdo con los resultados de los experimentos de polarización, se conectaron los electrodos anódico y catódico con la carga externa final de 470Ω a largo plazo (circuito cerrado). Los datos de voltaje de la celda fueron monitoreados mediante el sistema automático de adquisición basado en un microcontrolador (véase el capítulo 2), conectado a una computadora personal. El intervalo de tiempo de monitoreo fue de 15 min durante un periodo de 43 días. Los datos obtenidos fueron transformados para su análisis de la misma forma a lo mencionado anteriormente. La producción total de bioelectricidad (Joules) fue calculada según Helder *et al.* (2010); Apollon *et al.* (2020). La humedad del sustrato fue monitoreada en el mismo intervalo de tiempo antes mencionado con un sensor de humedad (Sensor Capacitivo Anticorrosivo Arduino, KZRU25884, China).

3.2.7. Análisis estadístico

De los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza ANOVA) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para la comparación de medias ($P < 0.05$) utilizando Minitab 2019. Posteriormente, se utilizó el Software GraphPad Prism, Versión 9.0.1 (151) para graficar los datos de bioelectricidad.

3. 3. Resultados y Discusión

3.3.1. Monitoreo de pH y CE en las muestras de orina

Los resultados indicaron que los tres tipos de orinas se comportaron de manera diferente con respecto a la CE y el pH durante el periodo de operación de las P-MFC. La Figura 3.2a representa la CE de las orinas (sin diluir) previo a la adición. Se pudo observar que la orina de ovino (P-MFC-4) y la de caprino (P-MFC-3) mostraron CE de $9.42 \pm 0.71 \text{ mS cm}^{-1}$ y $9.18 \pm 0.44 \text{ mS cm}^{-1}$, respectivamente. Mientras la orina de bovino (P-MFC-2) tuvo una CE de $8.65 \pm 0.53 \text{ mS cm}^{-1}$. Sin embargo, el agua de riego (P-MFC-1* sin inocular) mostró una CE de $0.96 \pm 0.06 \text{ mS cm}^{-1}$. Zang *et al.* (2012) reportaron CE de 8.43 mS cm^{-1} y 8.24 mS cm^{-1} en orina humana fresca y pretratada después de inocular un sistema de MFC, respectivamente. Estos valores son más bajos de un 10.5 % y 12.52 % en comparación a los encontrados en este experimento, usando orinas de ovino y de caprino almacenadas 72 horas previo a la adición en las P-MFC, respectivamente.

En estudios anteriores, valores de pH similares de orinas frescas han sido reportados: (i) orina de bovino (You *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2015) y (ii) orina humana (Ieropoulos *et al.*, 2012), respectivamente. En la Figura 3.2b se observa el pH obtenido de los diferentes tipos de orinas aplicadas en este estudio. Los valores registrados en los tres tipos de orina sin diluir fueron: (a) 8.80 ± 0.17 (P-MFC-4), 8.80 ± 0.1 (P-MFC-3), 8.83 ± 0.05 (P-MFC-2) y 8.2 ± 0.23 para el control (P-MFC-1*), respectivamente. Por otro lado, la Figura 3.2c indicó el monitoreo de CE en las orinas después 57 días de inoculación, donde la orina de ovino (P-MFC-4) mostró una CE más alta con un valor de $10 \pm 0.76 \text{ mS cm}^{-1}$; y en el mismo periodo alcanzó un pH de 9.03 ± 0.51 (Figura 3.2d). En estudios previos, se han reportado valor más alto (71.41 %) de la CE en orina de bovino ureolizada. La CE reportada fue de 39 mS cm^{-1} , la cual tenía un pH de 9.2 (Dai *et al.*, 2014).

En otros trabajos, valores de pH similares (9.2) fueron logrados al utilizar orina humana para la recuperación de nutrientes y generación de electricidad (Liu *et al.*, 2008, You *et al.*, 2016). La orina fue adicionada durante horas en el sistema de celda de combustible microbiana. Estos valores encontrados coincidieron con lo reportado en este estudio. Según Udert *et al.* (2003), la hidrólisis de urea por microorganismos ubicuos aumenta naturalmente el pH de la orina. Probablemente, los microorganismos electrogénicos presentes en las MFC juegan también un papel crucial en la hidrólisis de la urea (You *et al.*, 2016). Se reportó una CE de 12.3 mS cm^{-1} , la cual fue 18.69 % más alta en comparación a la CE de la orina de ovino reportada en este estudio después de 1368 horas (57 días) de la adición en la P-MFC (You *et al.*, 2016).

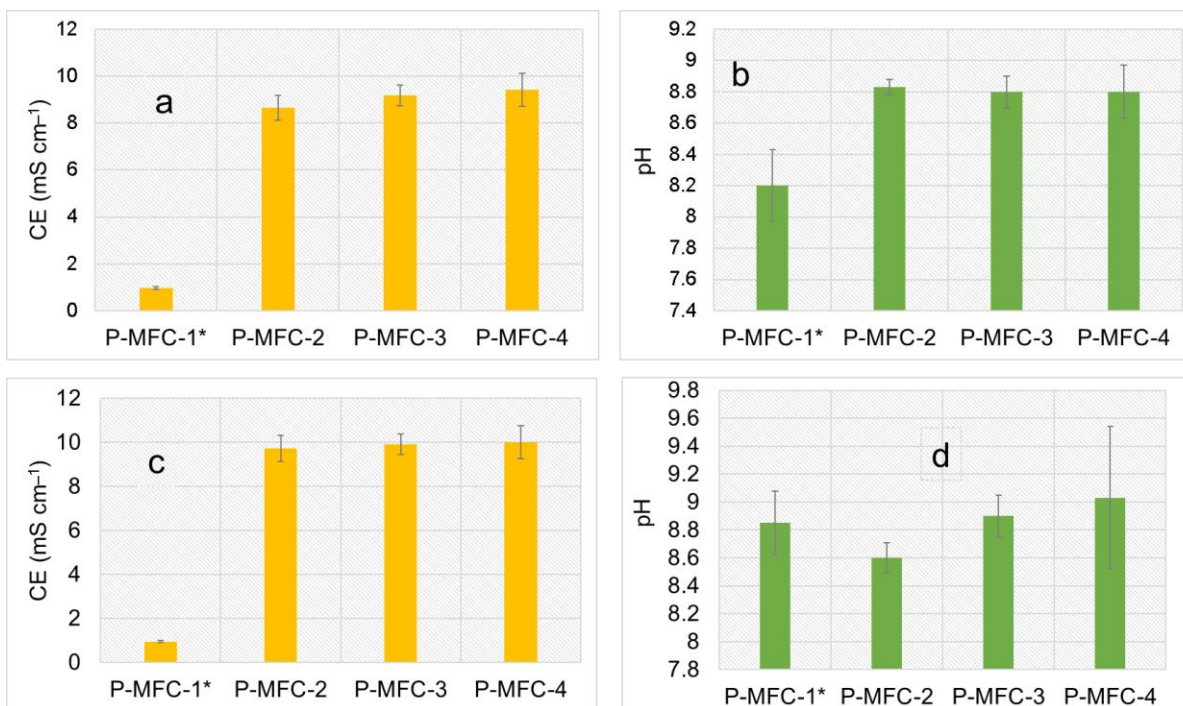


Figura 3.2. El pH y la CE de la orina durante la primera etapa del experimento. CE (a) y pH (b) 72 horas antes de la inoculación; CE (c) y pH (d) 120 horas después de la inoculación.

3.3.2. Cantidad de nutrientes

La composición química de los tres tipos de orina empleados en este experimento se encuentra en el Cuadro 3.1. Se observó un aumento significativo tanto en el pH, así como en la CE de la orina de los tres tipos de animales domésticos. La CE de la orina de cabra aumentó 76.64% (39.3 mS cm^{-1}) con un pH de 7.03. Seguido por la orina de oveja indicando un incremento de la CE de 61.7% (24.6 mS cm^{-1}) con un pH de 9.03; y la orina de bovino alcanzando un aumento la CE de 48.47% (12.75 mS cm^{-1}) con un pH de 7.41, respectivamente. Se puede observar que la orina de bovino y cabra mostró un pH similar (neutro), lo que es ideal para un mejor crecimiento bacteriano. El Cuadro

3.1 muestra las concentraciones de nitrógeno tanto en forma de amoníaco ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) como de nitrato ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) y P (forma de fosfato) que se encuentran en cada tipo de orina. La concentración más alta de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fue hallada en la orina de oveja fue $407 \pm 4.12 \text{ mg L}^{-1}$; que fue mayor en un 18.91% en comparación con la concentración de nitrógeno amoniacal (330 mg L^{-1}) reportada en otro estudio con orina de bovino (Dai *et al.*, 2014). Mientras que, la orina de cabra y orina de bovino presentaron concentraciones de $323 \pm 12.4 \text{ mg L}^{-1}$ y $196 \pm 10.1 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, respectivamente. Por tanto, la orina de cabra mostró mayor concentración de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($7306 \pm 26.1 \text{ mg L}^{-1}$); seguida por la orina de bovino con una cantidad de $3401 \pm 19.2 \text{ mg L}^{-1}$ y orina de oveja con una concentración de $504 \pm 3.51 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Para PO_4^{3-} , la tasa de concentración más alta se encontró en la orina de oveja con un valor de $23.0 \pm 1.09 \text{ mg L}^{-1}$. Este valor fue menor (87.07%) en relación con la concentración de P (178 mg L^{-1}) reportada en un sistema de recuperación de fósforo (ureólisis microbiana) usando orina catalizada por agua de mar (Tang *et al.*, 2015). Además, la orina de cabra presentó un mayor porcentaje de MO ($1.82 \pm 0.6\%$) y CO ($1.058 \pm 0.1\%$) en comparación con los otros tipos de orina utilizados en este estudio. Finalmente, los resultados indicaron cantidades de K de 1200 ± 6.7 y $1180 \pm 14.35 \text{ mg L}^{-1}$ en muestras de orina de oveja y cabra, respectivamente (Cuadro 3.1).

Por otro lado, el Cuadro 3.2 muestra un aumento significativo en la composición química de las tres diferentes muestras de orina de animales domésticos. Estos resultados se lograron en la etapa final de este estudio. La CE y el pH han aumentado un 84.18 % (80.6 mS cm^{-1}) y 19.71 % (9.23), respectivamente, para la muestra orina de bovino. Este incremento fue mayor con respecto a los demás tipos de muestras.

Los resultados también indicaron que la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ aumentó en un 94.68 % ($3690 \pm 21.3 \text{ mg L}^{-1}$); fue el valor más alto obtenido en comparación con las muestras de orina de oveja y de cabra. Sin embargo, para la concentración de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, la muestra de orina de cabra mostró mayor rendimiento de $7608 \pm 27,17 \text{ mg L}^{-1}$ (aumento del 3.96 %). Los resultados anteriores son superiores a los encontrados por Sharma y Mutnuri (2019) usando orina humana sin diluir en una cámara doble de placa MFC. Ellos reportaron concentraciones de NH_4 y NO_3 de $674 \pm 23 \text{ mg L}^{-1}$ y $246 \pm 42 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. La muestra de orina de bovino mostró un aumento de 98.70 % de PO_4^{3-} en este estudio. Además, se obtuvo un incremento de 33.33 % en la concentración de K para la misma muestra de orina de bovino. Seguido de la muestra de orina de oveja con un aumento del 1.67 %. Sin embargo, en la orina de cabra no se observó ningún aumento, es decir, indicó el mismo valor en las dos etapas del experimento (Cuadro 3.2).

El aumento del pH en todas las muestras de orina se debe a la conversión de N a NH_3 en el cámara de cátodo. Para el tratamiento eficaz de la orina mediante sistemas bioelectroquímicos, se deben tenerse en cuenta varios factores. Estos incluyen el pH de la muestra, la tasa de carga orgánica, y también la capacidad de los microorganismos para degradar la materia orgánica (Sharma y Mutnuri, 2019). En resumen, un pH alcalino facilita la reducción de oxígeno, pero un pH neutro permite el crecimiento bacteriano óptimo (Rozendal *et al.*, 2006).

La orina de ganado es una fuente de fertilización sostenible y confiable en la agricultura, debido a su alta concentración de nitrógeno (N) total, además de otros elementos esenciales como P y K que la planta necesita para su crecimiento. Hoy en

día, la orina del ganado se convierte en una fuente ideal del ciclo del N en los sistemas agrícolas. Por lo tanto, la cantidad de N (a partir la orina del ganado) que vuelve al suelo en forma de urea es aproximadamente de 125-250 kg ha⁻¹ año⁻¹ (Whitehead *et al.*, 1986). Se informó que la proporción de urea en la orina de oveja y la orina de bovino varía entre el 25 % y el 90 %, respectivamente (Lantinga *et al.*, 1987). Las tasas de concentración de N, P y K encontradas en este estudio indicaron que el uso de los tres diferentes tipos de orina en P-MFC es factible y representa una fuente sostenible de nutrientes para las plantas.

Cuadro 3.1. Análisis químico inicial de las muestras de orina.

Parámetros	Orina de bovino	± DE	Orina de cabra	± DE	Orina de oveja	± DE
pH	7.41		7.03		9.03	
CE (mS cm ⁻¹)	12.75		39.3		14.6	
Na (mg L ⁻¹)	64 bc	5.2	260 b	5.6	305 bc	3.63
K (mg L ⁻¹)	1000 ab	3.65	1200 ab	6.7	1180 a	14.35
Ca (mg L ⁻¹)	12.0 cd	0.03	53.1 c	1.4	2.0 c	0.01
Mg (mg L ⁻¹)	300 b	12.5	560 b	14.7	1100 a	6.96
NO ₃ ⁻ -N (mg L ⁻¹)	3401 a	19.2	7306 a	26.1	504 ab	3.51
NH ₄ ⁺ -N (mg L ⁻¹)	196 b	10.1	323 b	12.4	407 bc	4.12
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	2.0 d	0.4 b	5.0 bc	0.1	23.0 cd	1.09
CO (%)	0.283 e	0.04	1.058 c	0.1	0.58 d	0.17
MO (%)	0.48 e	0.04	1.82 c	0.6	0.09 d	0.01

DE= Desviación estándar. **CO** = Carbono orgánico y **MO** = Materia orgánica. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

Cuadro 3.2. Análisis químico final de las muestras tras la inoculación de los reactores.

Parámetros	Orina de bovino	± DE	Orina de cabra	± DE	Orina de oveja	± DE
pH	9.23		9.2		9.57	
CE (mS cm ⁻¹)	80.6		43.4		24.6	
Na (mg L ⁻¹)	1601 bc	23	615 b	13.24	1402 a	16.7
K (mg L ⁻¹)	1500 cd	15.6	1200 ab	6.7	1200 ab	14.6
Ca (mg L ⁻¹)	12.0 de	3.0	78.2 cd	2.06	4.0 cd	0.02
Mg (mg L ⁻¹)	6450 a	32.6	607 bc	15.93	2100 a	13.3
NO ₃ ⁻ -N (mg L ⁻¹)	1705 bc	8.8	7608 a	27.17	560 bc	3.9
NH ₄ ⁺ -N (mg L ⁻¹)	3690 ab	21.3	495 c	19.0	680 bc	6.9
PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	154 d	7.2	7.23 d	0.14	40.0 c	1.9
CO (%)	0.919 e	0.08	1.68 d	0.15	0.170 d	0.05
MO (%)	1.58 e	0.21	2.0 d	0.65	0.29 d	0.07

DE = Desviación Estándar. **CO** = Carbono orgánico y **MO** = Materia orgánica. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

3.3.3. Parámetros fisicoquímicos del sustrato

Los resultados fisicoquímicos de la etapa inicial del estudio indicaron que el sustrato presentó un porcentaje de MO de 5.6 %, un pH de 7.56 y una CE de 1.41 mS cm^{-1} (Cuadro 3.3). Las tasas de concentración de nutrientes disponibles en la muestra de sustrato fueron $194.828 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{NO}_3^- - \text{N}$, 8.813 mg L^{-1} de $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ y 70.025 mg L^{-1} de K, respectivamente. La CIC del sustrato antes de su uso fue de 14.76 mEq /100 g de suelo, la cual se encontraba en el rango apropiado (FAO, 2018). Después de la inoculación de los reactores (etapa final del experimento), se observó un aumento de los parámetros fisicoquímicos del sustrato. Sin embargo, se observó una ligera disminución del pH en cada sustrato que contenía las P-MFC instaladas. La P-MFC-4 indicó CE y CIC más altas de 18.10 mS cm^{-1} (mejora del 92.15 %) y $181.60 \text{ mEq L}^{-1}$ (mejora del 91.87 %), respectivamente (Cuadro 3.3). El menor incremento lo presentó P-MFC-1* (sin tratamiento), logrando valores de CE de 5.18 mS cm^{-1} (72.58 %) y CIC de 52.75 mEq /100 g de suelo (72.01 %), respectivamente.

Para las tasas de concentración de nutrientes en el sustrato, se notó un aumento significativo luego de aplicar los diferentes tipos de orina. La muestra de P-MFC-4 inoculada con orina de oveja mostró mayor contenido de NO_3^- con un valor de $4802.520 \text{ mg L}^{-1}$, y $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ de 1.945 mg L^{-1} . Seguida por las muestras de P-MFC-3 (con orina de cabra), P-MFC-2 (con orina de bovino) y P-MFC-1* (sin inoculación); alcanzando concentraciones de NO_3^- de 1978.606, 697.934 y $666.004 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. El aumento de NO_3^- observado en este estudio podría deberse a diversos aspectos como el tipo de sustrato, concentración de CO_2 , cantidad de MO contenida en el sustrato, etc. (Schleppi *et al.*, 2019). En otros lugares, se ha encontrado

una mayor disponibilidad de NO_3^- en suelos ubicados debajo de árboles, que fueron sometidos a un tratamiento con CO_2 (Schleppi *et al.*, 2012). En este caso, también se observó un aumento en la mineralización y nitrificación del nitrógeno en el suelo. La descomposición acelerada de la MO en el suelo conduce directamente a la liberación de nutrientes minerales (Kuzyakov, 2010). Según Nie *et al.* (2013), una alta concentración de CO_2 en el suelo permite una mayor liberación de exudados (rizodepósitos) por parte de las raíces de las plantas. Desafortunadamente, en nuestro estudio, no pudimos determinar la cantidad de CO_2 presente en el sustrato. Sin embargo, con base en lo anterior, se puede argumentar que el CO_2 es uno de los factores que influyen en el aumento de NO_3^- en este estudio. Además, *Stevia rebaudiana* extrae altos contenidos de N, P, K (requerimiento) anualmente en el suelo. Por ejemplo, extrae 162 kg ha^{-1} de N para la producción de 2500 kg de biomasa seca (hojas secas) (Clementelli y Zevallos, 2009). Pero, el requerimiento de N varía dependiendo de la cantidad de biomasa producida. Es importante mantener adecuadamente la concentración de este elemento en el suelo cuando se utiliza esta especie de planta.

Por otro lado, las muestras de P-MFC-2 y P-MFC-4 mostraron tasas de concentración de $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ de 1.945 mg L^{-1} , las cuales resultaron ser iguales en comparación con las otras muestras de P-MFC analizadas en este estudio (Cuadro 3.3). Esta disminución de fosfato se debe a su alta actividad química, así como a su alta demanda. El P es crucial para la actividad metabólica de cualquier organismo vivo. Por ejemplo, tanto los microorganismos del suelo como las plantas normalmente reciben P de las formas inorgánicas más disponibles, es decir, PO_4^{3-} ; por tanto, la estabilización de P depende

de la complejidad del elemento de unión (Tapia-Torres y García-Oliva, 2013). La muestra de P-MFC-4 indicó un aumento del 88.21 % de K; seguida por la P-MFC-3 con un incremento del 81.50 %, P-MFC-2 con un incremento del 50.01 % y P-MFC-1* alcanzando un incremento del 3.81 %, respectivamente. Mientras que se observó una disminución del 37.32 % (de 5.60 a 3.51 %) de MO en la etapa final del experimento. Esta disminución podría atribuirse al consumo acelerado de MO por microorganismos electrogénicos presentes en la superficie de P-MFC inoculada con orina de oveja.

Cuadro 3.3. Composición química del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos.

Parámetros	Análisis inicial	Análisis final del sustrato después de la inoculación de los reactores con orina			
		P-MFC-1*	P-MFC-2	P-MFC-3	P-MFC-4
pH	7.56	7.39	7.25	7.26	7.29
MO (%)	5.60	5.01	4.67	4.58	3.51
CE (mS cm ⁻¹)	1.42	5.18	6.12	8.95	18.10
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	194.828	666.004	697.934	1978.606	4802.520
PO ₄ ³⁻ -P (mg L ⁻¹)	8.813	1.819	1.945	1.662	1.945
K (mg L ⁻¹)	70.025	72.800	140.088	378.547	594.407
CIC (mEq/100 g de suelo)	14.76	52.75	62.84	90.56	181.60

Nota: Datos obtenidos de una muestra por tratamiento.

3.4. Rendimiento de bioelectricidad

3.4.1. Circuito abierto

Los resultados indicaron un comportamiento similar en todas las P-MFC con respecto a la producción de voltaje promedio del día primero al día 6 de la puesta en marcha de las P-MFC (Figura 3.3). Sin embargo, el día 7 la producción disminuyó (10.74 %), luego empezó a incrementarse (11 %) a partir del día 8. Posteriormente, el sistema se estabilizó, y el día 13 se observó que el voltaje se incrementó de 45 %. Se ha reportado un comportamiento similar de P-MFC en otra parte, usando orina humana como tratamiento para incrementar la producción de electricidad (Simeon *et al.*, 2020). Dicho comportamiento fue registrado antes de inocular las P-MFC con orina. Esto se debe a que las condiciones de funcionamiento y la comunidad bacteriana de las P-MFC fueron semejantes (Simeon *et al.*, 2020). En la Figura 3.3, se pudo observar que la P-MFC-4 logró el pico más alto de voltaje promedio de 654.4 ± 0.14 mV el día 24, después de aplicar la orina de ovino. Mientras, la P-MFC-3 (inoculada con orina de caprino) presentó un valor promedio de 556 ± 0.02 mV, 48 h de la aplicación de las orinas (día 23). Por otra parte, la P-MFC-2 tratada con orina de bovino alcanzó un voltaje promedio de 499 ± 0.09 mV el día 26. El valor mínimo (332.4 ± 0.02 mV) lo presentó la P-MFC-1* (control) al día 25 del experimento.

Gajda *et al.* (2020^a) reportaron el rendimiento de voltaje de 750 mV al utilizar orina humana como subproducto de electricidad en una celda de combustible microbiana (MFC) para la inactivación de especies patógenas. Este rendimiento fue logrado a los

7 días de operación de las MFC. Este resultado fue más alto de un 12.74 %, 15.12 % y 40.10 % en comparación a los reportados en este experimento cuando se aplicaron orina de ovino, de caprino y de bovino, respectivamente en las P-MFC. Se puede argumentar que la diferencia entre ambos experimentos se debe primero al periodo en el que se registró el rendimiento, luego a los tipos de materiales usados para la configuración de los sistemas. En este estudio, se registró el voltaje 72 h (3 días) después de aplicar los tratamientos. Sin embargo, en otros estudios valores de voltaje más bajos (57.21 % y 46.51 %, respectivamente) fueron reportados en sistemas de MFC inoculados con orina. Así, Cid *et al.* (2018) lograron rendimientos entre 280 mV y 350 mV usando orina en un entorno semicontrolado para generar electricidad. Por otro lado, Kumar *et al.* (2020) al probar una P-MFC similar (cantarito) en un campo de arroz para recuperar nutrientes, energía y agua, reportaron un rendimiento de 321.7 mV (a una temperatura de 32.9 °C); el cual fue más bajo (50.84 %) de lo alcanzado en este estudio.

El rendimiento de una P-MFC depende de diversos factores tales como: la temperatura, la radiación solar, los tipos de materiales anódico y catódico utilizados; y también el tiempo de operación del sistema. También, se han estudiado el efecto del día y la noche sobre el proceso de rizodeposición de las plantas usadas en sistemas bioelectroquímicos (Bombelli *et al.*, 2013; Kuzuma *et al.*, 2013). Dicho efecto influye mucho en la generación de electricidad. Moqsud *et al.* (2015) al investigar la planta de arroz, observaron que la radiación solar y la temperatura influyen en la generación de bioelectricidad. Estos dos factores son difíciles de evaluar al mismo tiempo. En este experimento todas las P-MFC fueron operadas en campo abierto.

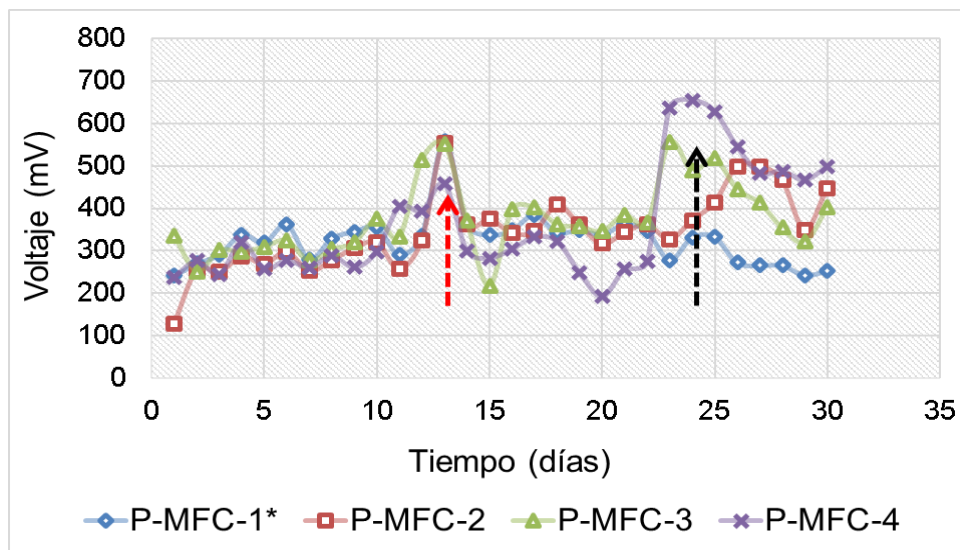


Figura 3.3. Salida de voltaje durante el periodo de inicio de operación de las P-MFC. La flecha punteada de color rojo indica la estabilización del sistema y la de color negro representa la aplicación de los tratamientos con orinas del ganado.

3.4.2. Experimentos de polarización

Las curvas de polarización en la Figura 3.4a indicaron que el valor de voltaje promedio en circuito abierto fue 586 ± 0.09 mV para la P-MFC-4. Mientras la P-MFC-3 alcanzó un valor promedio de 469 ± 0.02 mV, seguida por la P-MFC-2 (327 ± 0.04 mV) y la P-MFC-1* (110.5 ± 0.00 mV), respectivamente. La corriente más alta lograda en cortocircuito fue de 0.28 ± 0.14 mA (en P-MFC-4), mientras que el punto máximo de la potencia fue de 0.14 ± 0.08 mW (valor bajo) y, que corresponde a una densidad de potencia promedio de 0.91 ± 0.46 mW m⁻² (Figura 3.4b). Estos resultados fueron logrados antes aplicar los tratamientos. La densidad de potencia máxima lograda en otra parte (Simeon *et al.*, 2020) previo a la inoculación de una MFC con orina fue de

84.056 mW m^{-2} (en curva de polarización); y a una densidad de corriente de 215.53 mA m^{-2} . Estos rendimientos fueron más altos de un 98.91 % en comparación a los encontrado en este estudio previo a la aplicación de los tratamientos con orina del ganado. El rendimiento bajo logrado en este primer experimento de polarización fue debido a que el sistema no se había estabilizado para este periodo de operación.

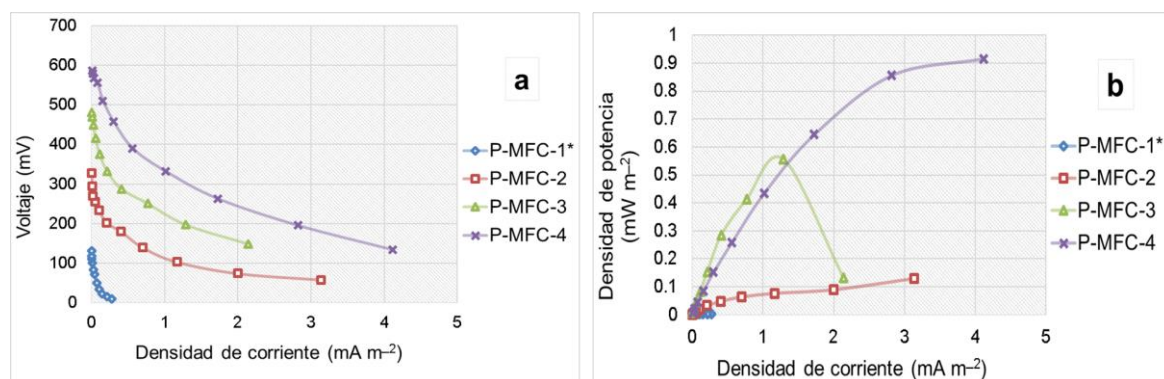


Figura 3.4. (a) Curvas de polarización y (b) curvas de densidades de potencia antes de aplicar los tratamientos con orinas.

La Figura 3.5^a representa las curvas de polarización obtenidas 72 h después de aplicar los tratamientos. Se observa que hubo diferencia entre los tratamientos con respecto a la generación de bioelectricidad. Las P-MFC-4 (inoculada con orina de ovino) indicó el OCV máximo con un valor 554 ± 0.09 mV en contraste con los demás tratamientos; a una densidad de corriente promedio de 7.11 ± 3.63 mA m^{-2} por área de crecimiento de la planta (PGA, por sus siglas en inglés). Mientras que la P-MFC-3 (tratamiento con orina de ovino) alcanzó una densidad de corriente de 5.89 ± 3.89 mA m^{-2} (PGA) y la P-MFC-2 (tratamiento con orina de caprino) mostró un valor de 2.31 ± 1.22 mA m^{-2} (PGA), respectivamente. Sin embargo, el valor promedio más bajo de la densidad de corriente (1.53 ± 0.9 mA m^{-2}) lo presentó la P-MFC-1* (control) sin tratamiento. Simeon *et al.* (2020) obtuvieron una densidad de corriente de 261 mA m^{-2} , 24 horas después

de la primera aplicación de la orina a una celda de combustible microbiana. Pero, al día 21 de la aplicación inicial se logró una densidad de potencia promedio de 70.75 mW m^{-2} , la cual disminuyó a 93.62% (4.508 mW m^{-2}) en el mismo periodo.

En estudios previos, los datos de polarización indicaron voltaje en circuito abierto de 579 mV (Gajda et al., 2020b). En un reactor inoculado con orina se logró un voltaje de 20 mV a una corriente de 280 mA . Se han reportado densidades de potencia volumétricas de 21.1 W m^{-3} (21100 mW m^{-3}) y 11.9 W m^{-3} (11900 mW m^{-3}), respectivamente. Esto equivale a un mejoramiento de 70% en cuanto a la potencia de salida. Estos resultados fueron más altos de 99.99% con los reportados en este estudio (véase el Cuadro 4).

Por otro lado, la densidad de potencia máxima promedio de $2.00 \pm 1.85 \text{ mW m}^{-2}$ (PGA) fue lograda en la P-MFC-4 (Figura 3.5b). Mientras, el valor mínimo de la densidad de potencia ($0.01 \pm 0.00 \text{ mW m}^{-2}$) fue obtenido en la P-MFC-1* (control). De lo anterior, se pudo confirmar que las orinas mejoraron la producción de bioelectricidad de un 95.45% . Kumar *et al.* (2020) reportaron densidades de potencia diferentes a las encontradas en este estudio, cuando los reactores fueron inoculados por los tres tipos de orinas. Al realizar las curvas de densidades de potencia, lograron valores de 9.1 mW m^{-2} y 16.8 mW m^{-2} utilizando dos tipos de reactores P-MFC, Tipo 1 (horizontal) y Tipo 2 (vertical), respectivamente.

En otros estudios de polarización, se encontraron densidades de potencia máxima de 6.60 mW m^{-2} en ecosistema semiárido (Apollon *et al.*, 2020), mientras que Kaku *et al.* (2008) hallaron una densidad de potencia de 6 mW m^{-2} en condiciones de inundación.

Además, en un campo de arroz (asistido con un cátodo de algas verde azulado), Srivastava *et al.* (2019) reportaron resultados diferentes con respecto a la curva de polarización; al lograr una densidad de potencia máxima de 29.78 mW m^{-3} y una densidad de corriente de 610 mA m^{-3} por el volumen de la superficie del ánodo. Estos rendimientos alcanzados fueron más altos en comparación a los encontrados en este experimento (Cuadro 4). Anteriormente, Liu y Logan (2004) reportaron valores de densidades de potencia más altas ($28 \pm 3 \text{ mW m}^{-2}$ y $146 \pm 8 \text{ mW m}^{-2}$, respectivamente) utilizando aguas residuales como sustrato en un único sin membrana cámara MFC. Posteriormente, Heilmann y Logan (2006) lograron resultados similares en una MFC de cámara única (SCMFC) que utiliza proteína como sustrato. En otra parte, se han informado densidades de potencia bajo de un 75 % para una celda de combustible microbiana de cámara única (SCMFC, por sus siglas en inglés) utilizando lixiviado de un vertedero (Greenman *et al.*, 2009). El funcionamiento de una SCMFC a mayor escala usando diferentes inoculantes y sustratos, influyó en el rendimiento de su densidad de potencia (Simeon *et al.*, 2020).

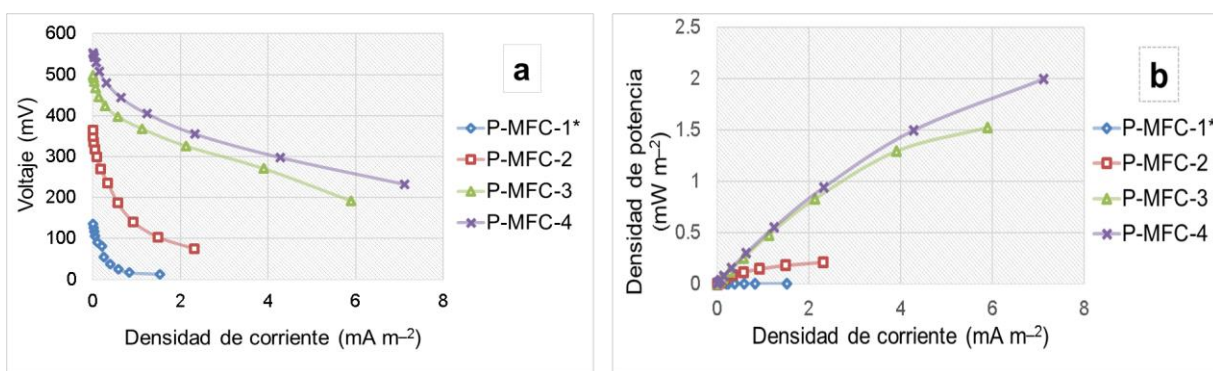


Figura 3.5. (a) Curvas de polarización y (b) densidades de potencia 72 h después de aplicar los tratamientos con orinas.

La generación de bioelectricidad aumentó significativamente ($P < 0.05$) durante el tercer experimento de polarización (Figura 3.6a y Cuadro 3.4). Se observó que el reactor P-MFC-4 inoculado con orina de oveja logró el rendimiento de bioelectricidad más alto en este estudio. Este reactor mostró un aumento del 68.25 % en el voltaje promedio (de 586 ± 19.9 mV a 1846 ± 22.09 mV) en relación con las otras P-MFC evaluadas en este estudio. El voltaje promedio más bajo fue mostrado por P-MFC-1* (sin inoculación) con un valor de 680 ± 1.09 mV. La densidad de potencia promedio más alta (pico más alto) de 59.81 ± 1.85 mW m⁻² se obtuvo en este reactor (con un aumento de 98.47%), con una densidad de corriente promedio de 213.50 ± 3.63 mA m⁻² (Figura 3.6b). Seguido por el reactor P-MFC-3 (inoculado con orina de cabra) alcanzando una densidad de potencia de 45.83 ± 1.29 mW m⁻² (aumento del 98.79%); y el rendimiento de la densidad de corriente para este período fue de 176.84 ± 3.89 mA m⁻². Sin embargo, entre los reactores P-MFC-2 y P-MFC-1*, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) para el parámetro de densidad de potencia (ver Cuadro 3.4). Kumar *et al.* (2020) cuando realizaron el experimento de curvas de densidad de potencia, alcanzaron valores de 9.1 mW m⁻² y 16.8 mW m⁻² utilizando dos tipos de reactores (C-MFC), Tipo 1 y Tipo 2, respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los encontrados en P-MFC-4 y P-MFC-3, por lo tanto, la densidad de potencia alcanzada en el reactor Tipo 1 coincidió con la encontrada en la P-MFC-1* evaluada en el tercer experimento de polarización.

Previamente, Liu y Logan (2004) reportaron densidades de potencia de 28 ± 3 mW m⁻² y 146 ± 8 mW m⁻², respectivamente; mediante el uso de un MFC con cámara única (SC-MFC) operando en aguas residuales. Posteriormente, Heilmann y Logan (2006)

lograron resultados similares en un SC-MFC que utiliza proteína como sustrato. En otros estudios, se han reportado densidades de potencia bajas del 75 % para un SC-MFC que utiliza lixiviados de un vertedero (Greenman *et al.*, 2009). El funcionamiento de una SC-MFC a gran escala utilizando diferentes inoculantes y sustratos influye en su rendimiento de densidad de potencia (Simeon *et al.*, 2020). En este estudio, también se tomó en cuenta de la densidad de potencia volumétrica. A continuación, se discutan los resultados encontrados en comparación con los reportados en otros estudios.

Srivastava *et al.*, (2019) informaron una densidad de potencia volumétrica máxima con un valor de 29.78 mW m^{-3} para una densidad de corriente de 610 mA m^{-3} con respecto al experimento de polarización. Este resultado fue menor de 41.80 % y 24.04 % en comparación con los encontrados en las P-MFC-4 y P-MFC-3, respectivamente (Cuadro 3.4). Sin embargo, éste fue mayor de 65.71 % y 62.24 % en comparación con los alcanzados en P-MFC-2 y P-MFC-1*, respectivamente. Recientemente, en un reactor inoculado con orina humana, se lograron densidades de potencia volumétrica de 21100 mW m^{-3} (21.1 W m^{-3}) y 11900 mW m^{-3} (11.9 W m^{-3}) (Gajda *et al.*, 2020b). Esto equivale a una mejora del 70 % en la producción de energía utilizando orina humana. Estos valores fueron 412 y 232 veces superiores a los reportados en las P-MFC-4 y P-MFC-3 evaluadas en este experimento. Esta diferencia podría atribuirse a los tipos de materiales utilizados, así como a los tipos y dosis de orina aplicada en cada experimento.

Cuadro 3.4. Rendimiento de polarización de los reactores P-MFC inoculados.

Parámetros	Tratamientos			
	P-MFC-1*	P-MFC-2	P-MFC-3	P-MFC-4
Voltaje (V)	0.064 ± 0.01c	0.251 ± 0.09b	0.640 ± 0.35a	0.772 ± 0.91a
I (mA)	5.93 ± 0.04 b	8.97 ± 0.60 ab	12.25 ± 0.27a	14.76 ± 0.25a
P (mW)	0.38 ± 0.02 c	2.18 ± 0.31 bc	7.84 ± 1.00ab	11.390 ± 2.01a
DI (mA m ⁻²)	85.62 ± 0.09 c	129.46 ± 1.22 b	176.84 ± 3.89ab	213.50 ± 3.63a
DP (mW m ⁻²)	10.70 ± 0.80 b	11.94 ± 0.20 b	45.83 ± 1.29ab	59.81 ± 1.85a
DI (mA m ⁻³)	73.26 ± 25 b	110.76 ± 33 b	151.30 ± 40.3ab	182.66 ± 61.11a
DP (mW m ⁻³)	9.16 ± 0.6 b	10.21 ± 0.55 b	39.21 ± 3.11ab	51.17 ± 5.01a

Datos medios obtenidos de cinco reactores. Las medias con la letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). **Nota:** I = Corriente; P = Potencia; DI = Densidad de corriente y DP = Densidad de potencia.

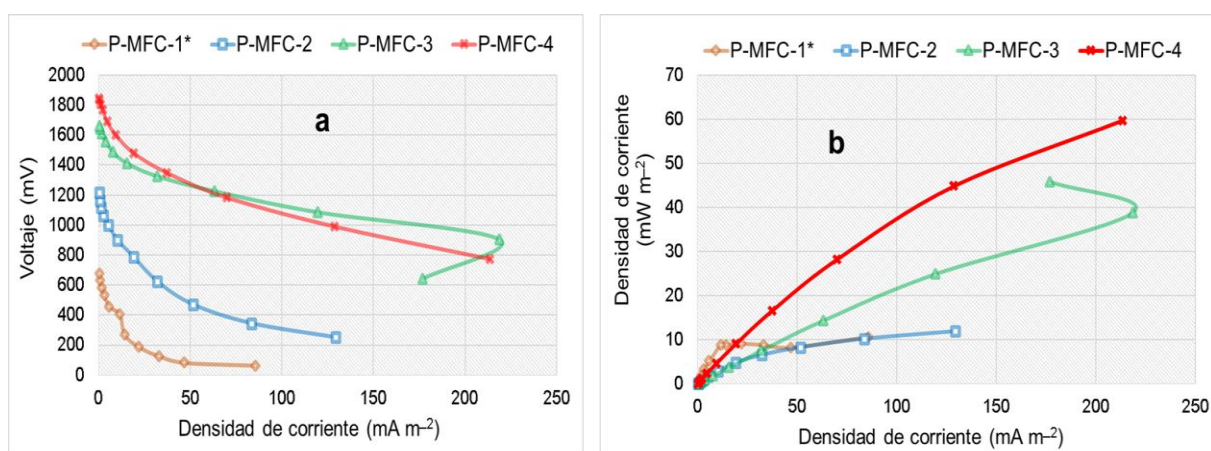


Figura 3.6. (a) Curvas de polarización y (b) curvas de densidades de potencia 24 horas antes del funcionamiento de los P-MFC en circuito cerrado.

3.4.3. Circuito cerrado

El rendimiento de los reactores P-MFC en operación a largo plazo fue evaluado durante 43 días. La generación de bioelectricidad fue afectada positivamente después de aplicar los tratamientos con orina en las P-MFC (Cuadro 3.5). Se pudo observar un comportamiento diferente entre los P-MFC con relación a la recuperación de energía. El voltaje de la celda aumentó de un 68.16 % en este experimento.

Cuadro 3.5. Rendimiento promedio de generación de bioelectricidad en circuito cerrado.

Parámetros	Tratamientos			
	P-MFC-1*	P-MFC-2	P-MFC-3	P-MFC-4
Voltaje (mV)	722.2 ± 14.8 b	1392 ± 476.51 a	1740 ± 0.00 a	1294 ± 273.09 a
I (mA)	4.04 ± 1.84 ab	4.42 ± 2.57 ab	6.44 ± 0.00 a	2.43 ± 0.48 b
P (mW)	3.21 ± 0.96 ab	2.96 ± 1.01 ab	3.70 ± 0.00 a	2.04 ± 1.12 b
DI (mA m ⁻²)	56.48 ± 20.14bc	74.36 ± 27.20 ab	77.45 ± 0.24 a	28.39 ± 14.24 c
DP (mW m ⁻²)	37.04 ± 3.84 ab	42.79 ± 14.62 ab	46.97 ± 0.67 a	19.28 ± 1.97 b
DI (mA m ⁻³)	48.66 ± 19.18 bc	55.66 ± 32.67 ab	72.40 ± 0.45 a	30.07 ± 16.44 c
DP (mW m ⁻³)	45.33 ± 18.10 a	36.56 ± 12.51 a	39.55 ± 0.00 a	25.11 ± 13.87 b

Datos medios obtenidos de cinco reactores. Las medias con la letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0.05$). **Nota:** **I** = Corriente; **P** = Potencia; **DI** = Densidad de corriente y **DP** = Densidad de potencia.

La Figura 3.7a muestra la generación de bioelectricidad obtenida en la P-MFC-1* (control) sin inocular. Se apreció una tendencia similar del día uno al día 13 de operación del sistema, donde alcanzó una densidad de corriente de 0.45 ± 0.16 mA m⁻². Posteriormente, el día 14 se incrementó de un 98.44 % (primer pico); y luego disminuyó 84.27 % el día 15. Mientras que, el día 16 se obtuvo un mejoramiento de

91.41 % de la densidad de corriente promedio alcanzando un pico de 56.48 ± 20.14 mA m⁻² (4.04 ± 1.84 mA); y la densidad de potencia máxima promedio logrado en la P-MFC-1* fue de 37.04 ± 3.84 mW m⁻² (3.21 ± 0.96 mW), cuando el sustrato contenía 100 % de humedad (Figura 3.8a). Una densidad de potencia diaria máxima de 9.6 mW m⁻² fue reportada en P-MFC triplicadas (en campo de arroz) (Sudirjo *et al.*, 2019), la cual fue 74.08 % más bajo que la densidad de potencia máxima promedio alcanzado en la P-MFC-1*. Ambos sistemas de P-MFC tuvieron la misma configuración. Luego, los días 19 y 26 se observó una disminución de la densidad de corriente de un 46.06 % y de un 49.15 %, respectivamente en la P-MFC-1*. Sin embargo, la generación de bioelectricidad se mantuvo constante del día 26 al 43 (etapa final del experimento). Durante este periodo se registró una disminución de 63.64 %. Por otro lado, la densidad de potencia reportada en una celda de combustible microbiana, incrustada con *Spartina anglica* (planta C₄) operada durante un periodo de 119 días (Timmers *et al.*, 2010), fue mayor (62.96 %) en comparación con el rendimiento promedio alcanzado en las P-MFC-1*.

En la Figura 3.7b se obtuvo la densidad de potencia máxima promedio de 42.79 ± 14.62 mW m⁻² (2.96 ± 1.01 mW), a un nivel de densidad de corriente promedio de 74.36 ± 27.20 mA m⁻² (4.42 ± 2.57 mA). Este rendimiento se alcanzó el día cuatro de operación de la P-MFC-2 (inoculada con orina de bovino), con una humedad relativa del sustrato de 100 %. Previo a la obtención del pico más alto de la densidad de potencia, esta se quedó muy estable del día uno al día cuatro de la puesta en marcha del sistema. La generación de electricidad y la humedad de sustrato se comportaron de manera diferente del inicio de funcionamiento de la P-MFC-2 hasta el final del

experimento (Figura 3.8b). El día 5, se apreció una caída considerable de 97.22 % en relación con la producción de bioelectricidad, la cual se mantuvo estable hasta el día 14. Por otro lado, el día 16 se observó un incremento de 85.59 % logrando una densidad de potencia máxima promedio de $14.30 \pm 5.23 \text{ mW m}^{-2}$; y una densidad de corriente promedio de $19.58 \pm 6.68 \text{ mA m}^{-2}$ durante el mismo periodo. Luego, se notó una producción estable del día 20 al día 37 y del día 40 al día 43 (etapa final del experimento).

El mejor rendimiento fue encontrado en los reactores inoculados con orina de caprino (Figura 3.7c), los cuales mostraron una densidad de potencia promedio de $46.97 \pm 0.67 \text{ mW m}^{-2}$ ($3.70 \pm 0.00 \text{ mW}$) y una densidad de corriente promedio de $77.45 \pm 0.24 \text{ mA m}^{-2}$ (el día 38). En la Figura 3.8c se pudo observar un comportamiento casi similar entre la humedad del sustrato y la densidad de potencia durante la operación a largo plazo. El pico más Del día 1 al día 9 se apreció una ligera disminución (3.89 %) de la corriente, la cual fue muy estable; y luego disminuyó de un 68.70 % el día 10 de operación de la P-MFC-3. Sin embargo, el mismo día 10 se estimó un incremento de un 67.56 %. Posteriormente, se obtuvo un decrecimiento de 75 % el día 31; y el día 32 regresó a ser estable hasta la etapa final del experimento. Mientras que las P-MFC-4 inoculadas con orina de ovino mostraron comportamiento diferente con respecto al rendimiento de bioelectricidad (Figura 3.7d). Se notó un comportamiento similar del día 16 al día 27 de operación de los reactores P-MFC-4. Luego, se obtuvo el pico más alto con relación a la densidad de potencia el día 35, alcanzando un valor de $19.28 \pm 1.97 \text{ mW m}^{-2}$ ($2.04 \pm 1.12 \text{ mW}$) para una densidad de corriente de $28.39 \pm 14.24 \text{ mA m}^{-2}$. Cabe señalar que este valor fue hallado cuando el sustrato alcanzaba su humedad

máxima (Figura 3.8d). La humedad del sustrato no influyó tanto en el rendimiento de la producción de bioelectricidad con este reactor. Para la operación a largo plazo se logró un rendimiento menor de un 47.94 % en comparación a la P-MFC-1* sin inocular.

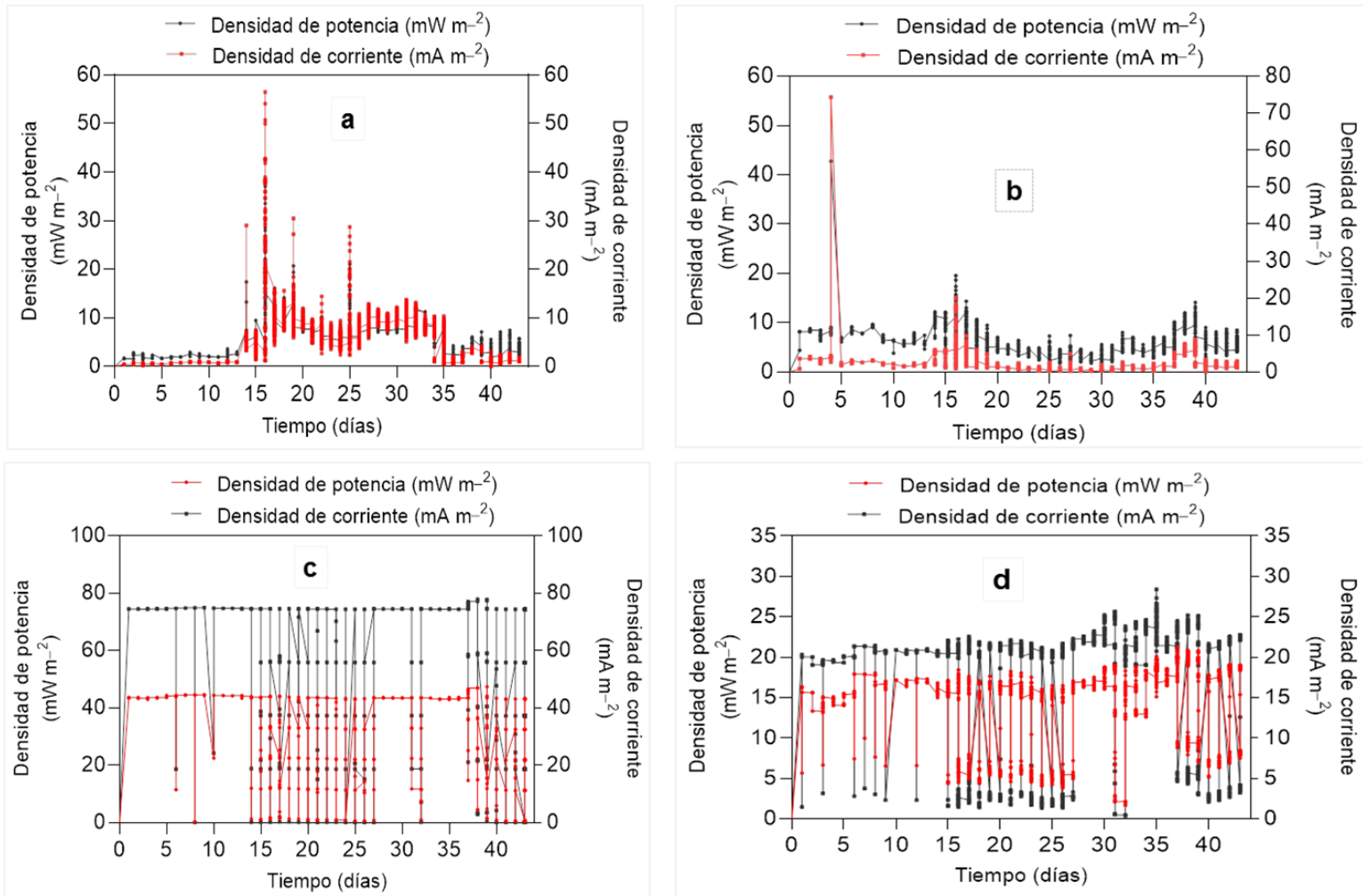


Figura 3.7. Curvas de densidades de potencia y curvas de densidades de corrientes en los reactores (a) P-MFC-1* (control), (b) P-MFC-2, (c) P-MFC-3 y P-MFC-4 durante 43 días de operación con los tratamientos.

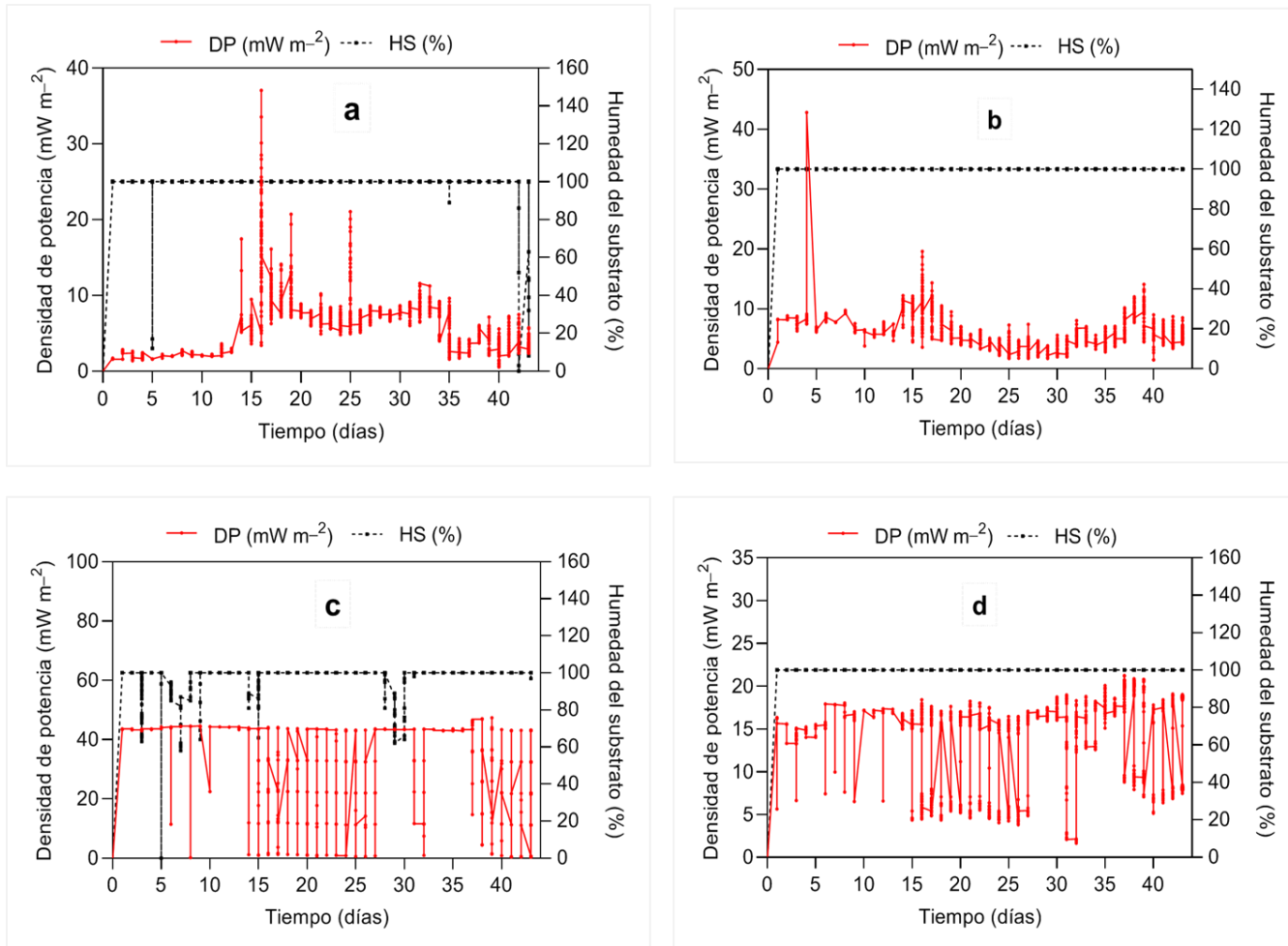


Figura 3.8. Comportamiento de la densidad de potencia con la humedad del sustrato frente al tiempo en: (a) P-MFC-1* (sin tratamiento), (b) P-MFC-2 (con orina bovina), (c) P-MFC-3 (con orina de cabra, (d) P-MFC (con orina de oveja) en 43 días de operación. Nota: **DP** = Densidad de potencia y **HS** = Humedad del sustrato.

Un comportamiento similar de generación de energía fue observado en otro estudio utilizando diferentes concentraciones de orina humana en MFC (Prudente et al., 2021). La disminución drástica de densidad de corriente en cualquier reactor MFC inoculado con orina se debe al aumento de la concentración de la orina aplicada en el mismo; y también se asocia directamente a una disminución concomitante en la comunidad bacteriana activa, por los cambios de pH y efecto de toxicidad por amoníaco (Prudente et al., 2021). La variabilidad de la producción de bioelectricidad observada en este estudio se atribuyó a la concentración de orina, la cual fue relacionada de manera directa con las bacterias electroquímicamente activas desarrolladas en la cámara del ánodo.

Una densidad de potencia máxima de $29.64 \pm 2.3 \text{ mW m}^{-2}$ fue reportada en estudio previo en MFC inoculadas con orina humana y operadas por 90 días (Salar-García et al., 2020). Este rendimiento fue obtenido el día 30 de operación de los reactores MFC. Este resultado fue más bajo de un 30.73 % en comparación a lo encontrado este estudio en la P-MFC-2 inoculada con orina de bovino (día cuatro) y de un 36.89 % en la P-MFC-3 inoculada con orina de cabra (día 38), respectivamente. Esta diferencia en salida de potencia registrada entre ambos sistemas se debe a varios factores como (i) tipo de orina y cantidad aplicada, (ii) tiempo de monitoreo y (iii) configuración de los sistemas, etc. Aunque se usaron en ambos casos MFC cilíndricas, pero la diferencia se nota en el uso de planta incrustada al sistema en este estudio. El uso de plantas en MFC mejora la salida de potencia a largo plazo, aumentando el contenido de biomasa de la planta para impulsar el sistema bioelectroquímico. Por otra parte, la salida de potencia lograda en la P-MFC-3 fue casi aproximadamente tres veces mayor en

comparación a la potencia alcanzada en otro estudio en cascada MFC inoculada con orina (Obata *et al.*, 2020) y en cascada MFC inoculada con lodo activado (Ieropoulos *et al.*, 2019), respectivamente.

Asimismo, la generación de energía fue afectada por los cambios drásticos de las condiciones ambientales durante el periodo monitoreo de bioelectricidad en este estudio. La temperatura media (máxima) durante las mediciones fue de 32.3 ± 16.9 °C y la mínima de 10 ± 5.23 °C. La humedad relativa promedio fue de 64.74 ± 20.46 %. Los picos más altos de densidad potencia se obtuvieron cuando subió la temperatura, y los más bajos cuando esta bajó. Este comportamiento de generación de bioelectricidad fue reportado anteriormente (Moqsud *et al.*, 2015). Además, otros factores que afectan la eficiencia de la producción de bioelectricidad se analizaron anteriormente en la Sección 3.4.1.

En este experimento, se obtuvo mayor producción total de electricidad promedio de 2917.08 kWh ha⁻¹ año⁻¹ en la P-MFC-3 inoculada con orina de caprino. Mientras que la PMFC-1* sin inocular presentó un valor promedio de 2530.75 kWh ha⁻¹ año⁻¹; seguida por la P-MFC-2 inoculada con orina de bovino (2333.65 kWh ha⁻¹ año⁻¹) y la P-MFC-4 (inoculada con orina de ovino) indicando una producción total de electricidad de 1608.33 kWh ha⁻¹ año⁻¹, durante un periodo de 6 semanas (3, 888,000 s) de funcionamiento de los reactores de P-MFC. Cabe mencionar que el valor más alto de producción total de electricidad alcanza en la P-MFC-3, se debe a que fue el reactor que presentó el mejor rendimiento de salida de potencia en este estudio. Los valores de la potencia fueron obtenidos en circuito cerrado cuando se empleó una carga externa de 470 Ω. Estos resultados fueron superiores en comparación con la

producción total de electricidad reportada en P-MFC incrustadas con especies de *Opuntia* durante cuatro semanas (Apollon *et al.*, 2020); y también en P-MFC operadas durante un periodo de 26 semanas empleando *S. anglica* y *A. anomala* (Helder *et al.* 2010) con una resistencia externa de 1000 Ω , respectivamente. Previamente, Strik *et al.* (2008) reportaron una producción de energía total de 5800 kWh ha⁻¹ año⁻¹ en una P-MFC incrustada con *Glyceria maxima*, en un periodo comprendido entre 50 y 118 días de operación. Esta producción de electricidad estimada fue 49.70% mayor en comparación con la producción total de electricidad alcanzada en P-MFC-3 inoculada con orina de cabra en este estudio. Cabe mencionar que estos resultados fueron prometedores bajo la explotación de condiciones ambientales sostenibles. En el caso de *G. maxima*, se requerirían condiciones de anegamiento adicionales para un desempeño superior en la producción de energía; a temperatura controlada, *p. ej.*, con iluminación artificial.

3.5. Sostenibilidad energética

La producción de energía en todo el mundo genera aproximadamente el 26 % de las emisiones de gases de efecto invernadero que causan el calentamiento global (Apollon *et al.*, 2021). Por tanto, la generación de electricidad por BES debe ser investigada más a fondo para que su aplicación tanto en tiempo real, así como a gran escala sea sostenible, *v. gr.*, amigable con el medio ambiente. En este estudio, se evaluaron los sistemas P-MFC utilizados para la generación de electricidad. La evaluación se realizó sobre la base de los requerimientos energéticos globales (GER, por sus siglas en

inglés) reportados por Tommasi y Lombardelli (2017). En el Cuadro 3.6 se describen los diferentes materiales utilizados en este estudio, así como su peso y energía indirecta (IE, por sus siglas en inglés) producidos de acuerdo con GER. Según GER, los resultados indican que los materiales de construcción de una P-MFC experimental producen una energía indirecta total de 330.84 MJ (0.33084 J).

La producción de electricidad promedio total (J) generada por los sistemas P-MFC (durante seis semanas) se analizó en el último párrafo de la sección 3.4.3, sin embargo, en esta sección, se quiere enfatizar la producción total de electricidad en una P -MFC individual (por tratamiento) durante un mes (datos no mostrados). La producción total de electricidad $> 300 \text{ J mes}^{-1}$ se logró en al menos tres P-MFC diferentes (P-MFC-3, P-MFC-1* y P-MFC-2, respectivamente). P-MFC-4 indicó una producción total de electricidad de $211.50 \text{ J mes}^{-1}$. Cuando el gasto energético directo se reduce a cero, y, además, la potencia neta es equivalente a la energía generada, el sistema empleado se vuelve comúnmente sostenible (Tommasi y Lombardelli, 2017); y su aplicación no tiene impacto en el medio ambiente. El objetivo principal de la sostenibilidad es la satisfacción de las necesidades humanas sin poner en peligro el medio ambiente. En este caso, la energía producida en el presente estudio puede ser sostenible porque la eficiencia de obtención de cada reactor de P-MFC fue positiva. Cabe mencionar que solo se pudo hacer cálculos de sostenibilidad de acuerdo con la literatura (Tommasi y Lombardelli, 2017), debido a que el objetivo principal de este estudio no fue estudiar la energía sostenible. Por último, la evaluación de la sostenibilidad de los sistemas bioelectroquímicos (como las P-MFC) es de suma importancia.

Cuadro 3.6. Cálculos de IE considerando el peso de los materiales según GER.

Material	Peso (g)	GER (MJ kg⁻¹)
Malla de acero inoxidable (cátodo)	100	29.44
Filtro de grafito (ánodo)	22.5	6.63
Caimanes	6.8 (*2)	4.0
Cables de cobre	18.79 (*2)	11.05
Membrana de taza de arcilla	950	279.72

Note. Estos materiales son para la configuración de una sola P-MFC. **MJ** = Mega Joules.

3.5.1. LCA de la P-MFC

La LCA es el implemento utilizado para evaluar los impactos ambientales de cualquier sistema o producto implementado en el medio ambiente, su ciclo de vida, así como su alcance y objetivo; también, el inventario e interpretación del ciclo de vida. La LCA fue uno de los métodos emergentes elegidos para evaluar tanto la producción de bioenergía como el secuestro de carbono durante la vida útil del producto, es decir, su ciclo de vida. Zhang *et al.* (2019b) han desarrollado modelos de LCA para descubrir el efecto ecológico de tres BES diferentes. Estos fueron la celda de electrólisis microbiana (MEC, por sus siglas en inglés), las MFC y la celda de desalinización microbiana (MDC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, se encontró que la MEC tuvo mayor desempeño ecológico en comparación con los demás sistemas MFC y MDC evaluados. Este comportamiento se observó en todas las categorías debido a la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a partir del uso de la MEC. El bajo rendimiento de la generación de energía de 10 W m⁻³ (densidad de potencia volumétrica) registrado en los sistemas MFC y MDC fue la causa de que estos tuvieran

impactos negativos en el medio ambiente. Además, existe una relación proporcional entre el cambio en los impactos ambientales y la densidad de potencia generada por los BES (Zhang *et al.*, 2019b). Esto significa que los impactos ambientales de las MFC y MDC dependen en gran medida del valor de la densidad de potencia producida por estos sistemas.

De acuerdo con lo anterior, considerando la producción de electricidad por semana y por mes lograda en este estudio (datos mostrados en los apartados 3.4.3 y 3.5, respectivamente) y también la vida útil de la P-MFC, se puede argumentar que este tipo de sistema no representa un daño al medio ambiente. Su uso es sostenible porque los materiales y tratamientos utilizados no provocan ningún impacto negativo en el medio ambiente. La orina de animales domésticos utilizada para inocular las P-MFC no afecta negativamente al medio ambiente. Además, es una reutilización sostenible de N, P y K orgánicos para las plantas.

3.6. Análisis económico-costo /beneficio de los materiales de configuración de las P-MFC

El Cuadro 3.7 muestra que para la configuración de una P-MFC usando una membrana de vaso de arcilla (cantarito), solo se necesita 13.62 USD. Este sistema es más económico en comparación con el reportado en otro estudio al configurar una P-MFC en forma tubular (Tubular-MFC) (Sudirjo *et al.*, 2019). Los materiales de construcción del Tubular-MFC tenían un costo de 27.45 USD (23,2 €) por metro de tubo, es decir, el costo de solo un Tubular-MFC. La P-MFC utilizada en este estudio permitió reducir

hasta en un 50.38 % el costo de construcción del Tubular-MFC, debido a que los tipos de materiales de los electrodos seleccionados eran más económicos. Estos resultados indicaron que la P-MFC utilizada en este trabajo es factible y debe investigarse con más profundidad para su aplicación a gran escala.

Cuadro 3.7. Material necesario para la construcción de las P-MFC y su estimación de costos.

Material P-MFC	Material necesario /P-MFC	Cantidad total	Precio /P-MFC (EE. UU.)	Precio unitario (EE. UU.)	Precio total + impuestos (EE. UU.)
Malla de acero inoxidable (cátodo)	0.03 m ²	1 m ²	0.83	27.74	27.74
Filtro de grafito (ánodo)	0.06 m ²	1 m ²	8.09	134.88	134.88
Foami (como tapa de taza de arcilla)	0.05 m ²	1 m ²	0.55	10.94	15.89
Barniz acrílico		2		2.89	6.69
Caimanes	2 unidades	11 paquetes	0.51	2.54	32.43
Cables inoxidables	3 m	96 m	0.60	0.20	22.48
Pinzas		1		8.91	10.34
Vaso de arcilla (membrana)	1	20	2.24	2.24	44.8
Resistencias		1		6.89	7.99
Sensores de humedad del suelo		30		1.61	57.85
Plantas		32		2.50	93.92
Bolsas de sustrato		20		2.50	49.95
Maceta		40		1.89	86.67
Malla de sombra		1		23.91	27.74
Electrodo selectivo (para pH y CE)		1		89.87	89.87
Computadora		1		174.79	174.79
Sistema de adquisición de datos		1		308.61	374.68
Costo total			13.62		1258.71

Nota: Precio unitario (EE. UU.) = Es el costo por unidad (p. ej., 1 m, paquete, etc.) de compra; y Precio total = Es el costo total de los materiales utilizados para realizar el experimento.

3.7. Conclusiones

El estudio ha evaluado el uso sostenible de la orina de tres animales domésticos en una celda de combustible microbiana vegetal basado en *Stevia rebaudiana* para la reutilización de nutrientes y la mejora de la producción de bioelectricidad. La cantidad de nutrientes (como N, P, K) estimada en cada tipo de orina resulta ser un buen índice para la producción de fertilizantes orgánicos. Se logró mayor recuperación de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (94.68 %), PO_4^{3-} (98.7 %) y K (33.33 %), respectivamente en la orina de bovino (P-MFC-2) en comparación con los otros tipos de orina evaluados en este estudio. Además, la generación de bioelectricidad se vio afectada de manera significativa ($P < 0.05$) por los tres tipos de orina de ganado. La densidad de potencia aumentó en un 98.47 % (experimento de polarización), i.e., de $0.91 \pm 0.46 \text{ mW m}^{-2}$ a 59.81 mW m^{-2} , con una densidad de corriente de $213.5 \pm 3.63 \text{ mA m}^{-2}$. Este rendimiento se logró en P-MFC-4 cuando se aplicó la orina de oveja. El rendimiento más bajo fue presentado por la P-MFC-1* sin inocular (testigo), mostrando una densidad de potencia de $10.70 \pm 0.80 \text{ mW m}^{-2}$ al mismo tiempo. Mayor generación de bioelectricidad en circuito cerrado (43 días) se logró en P-MFC-3 (inoculada con orina de cabra), indicando una densidad de potencia de $46.97 \pm 0.67 \text{ mW m}^{-2}$ ($3.47 \pm 0.07 \text{ mW}$) y una densidad de corriente de $77.45 \pm 0.24 \text{ mA m}^{-2}$; por tanto, P-MFC-4 inoculado con orina de oveja presentó la menor producción de bioelectricidad logrando una densidad de potencia de $19.28 \pm 1.97 \text{ mW m}^{-2}$ (1.38 ± 0.09). Según los Requerimientos Energéticos Globales, los materiales utilizados en este estudio para la configuración de un reactor P-MFC producen una energía indirecta total de 330.84 MJ. La fabricación de una P-MFC usando una membrana de copa de arcilla cuesta 13.29 USD. Este sistema es más económico en comparación con otros

reportados en otros estudios y se puede implementar en áreas rurales de bajos ingresos. La evaluación del ciclo de vida de las P-MFC inoculadas con orina de animales domésticos indicó que su uso no afecta negativamente al medio ambiente. Lo anterior ha demostrado la viabilidad de usar orina en sistemas bioelectroquímicos para mejorar tanto la producción de energía, así como la fabricación de nutrientes a bajo costo. Estos resultados prometedores llevarían a abrir los próximos estudios de investigación sobre agricultura integrada inteligente sostenible.

Referencias

- Apollon, W., Luna-Maldonado, A. I., Kamaraj, S.-K., Vidales-Contreras, J. A., Rodríguez-Fuentes, H., Gómez-Leyva, J. F. & Aranda-Ruíz, J. (2021). Progress and recent trends in photosynthetic assisted microbial fuel cells: A review. *Biomass Bioenergy* 148, 106028.
- Apollon, W., Sathish-Kumar, K., Silos-Espino, H., Perales-Segovia, C., Valera-Montero, L. L., Maldonado-Ruelas, V. A.,... & Gómez-Leyva, J. F. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: demonstration of their applications. *Appl. Energy* 279, 115788.
- Bombelli, P., Iyer, D. M. R., Covshoff, S., McCormick, A. J., Yunus, K., Hibberd, J. M. ... & Fisher, A. C. (2013). Comparison of power output by rice (*Oryza sativa*) and an associated weed (*Echinochloa glabrescens*) in vascular plant bio-photovoltaic (VP-BPV) systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 97, 429–438.
- Cid, C. A., Stinchcombe, A., Ieropoulos, I. & Hoffmann, M. R. (2018). Urine microbial fuel cells in a semi-controlled environment for onsite urine pre-treatment and electricity production. *J. Power Sources* 400, 441–448.
- Clementelli, A. & Zevallos, R. (2009). Mineral and organic nitrogen fertilization in the crop of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Univ. Cienc. Soc.* 1(1), 47–50.
- Clesceri, L. S., Eaton, A. D., Greenberg, A. E. & Franson, M. A. H. (1996). Standard methods for the examination of water and wastewater: 19th edition supplement. Washington, DC: American Public Health Association, 43p.
- Dai, J., Tang, W., Zheng, Y., Mackey, H. R. & Kwong, H. (2014). An exploratory study on Seawater-Catalysed Urine Phosphorus Recovery (SUPR). *Water Res* 66, 75–84.
- Dennison, F. J., Azapagic, A., Clift, R. & Colbourne, J. S. (1998). Assessing management options for sewage treatment works in the context of life cycle assessment. *Water Sci. Technol* 38 (11), 23–30.

- Dewis, J. & Freitas, F. (1970). Physical and chemical methods of soil and water analysis. FAO, Soils Bulletin N° 10, Rome, Italy, 275 p.
- Domínguez-Garay, A. & Esteve-Núñez, A. (2018). Designing strategies for operating microbial electrochemical systems to clean up polluted soils under non-flooded conditions. *Bioelectrochemistry* 124, 142–148.
- FAO (2018). The global status of seaweed production, trade and utilization. FAO Globefish Res. Program 124, 120.
- Fittschen, I. & Hahn, H. H. (1998). Characterization of the municipal wastewater part human urine and a preliminary comparison with liquid cattle excretion, *Water Sci. Technol* 38 (6), 9–16.
- Freguia, S., Logrieco, M. E., Monetti, J., Ledezma, P., Viridis, B. & Tsujimura, S. (2019). Self-Powered Bioelectrochemical Nutrient Recovery for Fertilizer Generation from Human Urine. *Sustainability* 11(19), 5490.
- Gajda, I., Greenman, J. & Ieropoulos, I. (2020b). Microbial Fuel Cell stack performance enhancement through carbon veil anode modification with activated carbon powder. *Appl. Energy* 262, 114475.
- Gajda, I., Obata, O., Greenman, J., Ieropoulos, I. A., 2020^a. Electroosmotically generated disinfectant from urine as a by-product of electricity in microbial fuel cell for the inactivation of pathogenic species. *Scientific Reports* 10, 5533.
- Greenman, J., Antonia, G., Lorenzino, G. & Ieropoulos, I. (2009). Electricity from landfill leachate using microbial fuel cells: comparison with a biological aerated filter. *Enzym Microb Technol* 44, 112–119.
- Heilmann, J. & Logan, B. E. (2006). Production of electricity from proteins using a single chamber microbial fuel cell. *Water Environ Res* 78, 531–537.
- Helder, M., Strik, D. P. B. T. B., Hamelers, H. V. M., Kuhn, A. J., Blok, C. & Buisman, C. J. N. (2010). Concurrent bio-electricity and biomass production in three Plant-

Microbial Fuel Cells using *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* and *Arundo donax*. *Bioresour. Technol* 101, 3541–3547.

Ieropoulos, I., Greenmanab, J. & Melhuisha, C. (2012). Urine utilization by microbial fuel cells; energy fuel for the future. *Phys. Chem. Chem. Phys* 14, 94–98.

Ieropoulos, I., Obata, O., Pasternak, G. & Greenman, J. (2019). Fate of three bioluminescent pathogenic bacteria fed through a cascade of urine microbial fuel cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 46, 587–599.

Ieropoulos, I., Pasternak, G. & Greenman, J. (2017). Urine disinfection and in situ pathogen killing using a Microbial Fuel Cell cascade system. *PLoS One* 12, 1–12.

Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y. & Watanabe, K. (2008). Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 79, 43–49.

Kumar, K. V., Man mohan, K., Manangath, P., Sreelakshmi, Manju, P. & Gajalakshmi, S. (2020). Resource recovery from paddy field using plant microbial fuel cell. *Process Biochem*, 99(12), 270–281.

Kouzuma, A., Kasai, T., Nakagawa, G., Yamamuro, A., Abe, A. & Watanabe, K. (2013). Comparative metagenomics of anode-associated microbiomes developed in rice paddy-field microbial fuel cells. *PLoS One* 8, 2–11.

Kugler, K., Ohs, B., Scholz, M. & Wessling, M. (2014). Towards a carbon independent and CO₂ –free electrochemical membrane process for NH₃ synthesis. *Phys. Chem. Chem. Phys* 16, 6129–6138.

Kuzyakov, Y. (2010). Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1363–1371.

Lantinga, E., Keuning, J. A., Groenwold, J. & Deenen, P. J. A. G. (1987). Distribution of excreted nitrogen by grazing cattle and its effects on sward quality, herbage

- production and utilization. Animal manure on grassland and fodder crops, H.G. v.d. Meer et al. (Eds.). Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht; pp.103–117.
- Larsen, T. A. & Gujer, W. (1996). Separated management of anthropogenic nutrient solutions (human urine). *Water Sci Technol* 34, 87–94.
- Larsen, T. A., Peters, I., Alder, A., Eggen, R., Maurer, M. & Muncke, J. (2001). Re-engineering the toilet for sustainable wastewater management. *Environ Sci Technol* 35(9), 192A–197A.
- Liu, H. & Logan, B. E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ Sci Technol* 38 (14), 4040–4046.
- Liu, Z., Zhao, Q., Wang, K., Lee, D., Qiu, W. & Wang, J. (2008). Urea hydrolysis and recovery of nitrogen and phosphorous as MAP from stale human urine. *J Environ Sci* 20, 1018–1024.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. & Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology†. *Environ. Sci. Technol* 40(17), 5181–5192.
- Logan, B. E. & Regan, J. M. (2006). Electricity producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol* 14, 512–518.
- Lundin, M., Bengtsson, M. & Molander, S. (2000). Life Cycle Assessment of Wastewater Systems: Influence of System Boundaries and Scale on Calculated Environmental Loads. *Environ. Sci. Technol* 34(1), 180–186.
- Moqsud, M., Azizul Hannan, M A. & Omine, K. (2015). Assessment of factors influencing bioelectricity generation in paddy plant microbial fuel cells. *Global Adv. Res. J. of Agricult. Sc* 4(12), 840–850.
- Nie, M., Lu, M., Bell, J., Raut, S. & Pendall, E. (2013). Altered root traits due to elevated CO₂: a meta-analysis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 22, 1095–1105.

- Obata, O., Salar-Garcia, M. J., Greenman, J., Kurt, H., Chandran, K. & Ieropoulos, I. (2020). Development of efficient electroactive biofilm in urine-fed microbial fuel cell cascades for bioelectricity generation. *J. Environ. Manage* 258,109992.
- Osorio de la Rosa, E., Vázquez-Castillo, J., Carmona-Campos, M., Barbosa-Pool, G., Becerra-Núñez, G., Castillo-Atoche, A.,... & Ortegón-Aguilar, J. (2019). Plant microbial fuel cells–based energy harvester system for self-powered IoT applications. *Sensors* 19, 1378.
- Prudente, M., Massazza, D. A., Busalmen, J. P. & Romeo, H. E. (2021). Urine dilution with a synthetic wastewater (Syntho) boosts the electricity production in a bio-electrochemical system powered by un-pretrated human urine. *Bioelectrochemistry* 137, 107639.
- Rebitzer, G. (2002). Integrating Life Cycle Costing and Life Cycle Assessment for Managing Costs and Environmental Impacts in Supply Chain. In: Seuring S, Goldback M (ed) *Cost Management in Supply Chains*, Physica-Verlag HD, pp 127–146.
- Rozendal, R. A., Hamelers, H. V. M. & Buisman, C. J. N. (2006). Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. *Environ. Sci. Technol* 40 (17), 5206–5211.
- Salar-García, M. J., Obata, O., Kurt, H., Chandran, K., Greenman, J. & Ieropoulos, I. A. (2020). Impact of Inoculum Type on the Microbial Community and Power Performance of Urine-Fed Microbial Fuel Cells. *Microorganisms* 8, 1921.
- Sathish-Kumar, K., Rivera, A.E., Murugesan, S., García-Mena, J., Maya, O., Frausto-Reyes, C., ... & Caballero-Briones, F. (2019). Electricity generation from Nopal biogas effluent using a surface modified clay cup (cantarito) microbial fuel cell. *Heliyon*. 5, e01506.
- Schleppi, P., Bucher-Wallin, I., Hagedorn, F. & Körner, C. (2012). Increased nitrate availability in the soil of a mixed mature temperate forest subjected to elevated CO₂ concentration (canopy FACE). *Glob. Change Biol.* 18, 757–768.

- Schleppi, P., Körner, C. & Klein T. (2019). Increased Nitrogen Availability in the Soil Under Mature *Picea abies* Trees Exposed to Elevated CO₂ Concentrations. *Front. For. Glob. Change*, 2, 59. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2019.00059>.
- Sharma, P. & Mutnuri, S. (2019). Nutrient recovery and microbial diversity in human urine fed microbial fuel cell. *Water Sci. Technol* 79(4), 718–730.
- Sharma, P., Talekar, G. V. & Mutnuri, S. (2021). Demonstration of energy and nutrient recovery from urine by field-scale microbial fuel cell system. *Process Biochemistry* 101, 89–98.
- Simeon, M. I., Asoiro, F.U., Aliyu, M., Raji, O.A. & Freitag, R. (2020). Polarization and power density trends of a soil-based microbial fuel cell treated with human urine. *Int J Energy Res* 44, 5968–5976.
- Slavin, M. (1978). *Atomic Absorption Spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York.
- Srivastava, P., Gupta, S., Garaniya, V., Abbassi, R. & Yadav, A.-K. (2019). Up to 399 mV bioelectricity generated by a rice paddy-planted microbial fuel cell assisted with a blue-green algal cathode. *Environmental Chemistry Letters* 17, 1045–1051.
- Strik, D. P. B. T. B., Hamelers, H. V. M., Snel, J. F. H. & Buisman, C. J. N. (2008). Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res* 32, 870–876.
- Sudirjo, E., Pim de Jager, Buisman, C. J. N. & Strik, D. P. B. T. B. (2019a). Performance and Long-Distance Data Acquisition via LoRa Technology of a Tubular Plant Microbial Fuel Cell Located in a Paddy Field in West Kalimantan, Indonesia. *Sensor* 19, 46–47.
- Tang, W. T., Dai, J., Liu, R. & Chen, G. H. (2015). Microbial ureolysis in the seawater-catalysed urine phosphorus recovery system: Kinetic study and reactor verification. *Water Res* 87, 10–19.
- Tapia-Torres, Y. & García-Oliva, F. (2013). Phosphorus availability is a product of soil bacterial activity in oligotrophic ecosystems: A critical review. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 231–242.

- Timmers, R.A., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V. & Buisman, C.J.N (2010). Long-term performance of a plant microbial fuel cell with *Spartina anglica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 86, 973–981.
- Tommasi, T. & Lombardelli, G. (2017). Energy sustainability of Microbial Fuel Cell (MFC): A case study. *J. Power Sources* 356, 438–447.
- Udert, K.M., Larsen, T.A. & Gujer, W. (2003). Biologically induced precipitation in urine-collecting systems. *Water Sci Technol Water Supply* 3, 71–78.
- Walter, X.A., Merino-Jiménez, I., Greenman, J. & Ieropoulos, I. (2018). PEE POWER@urinal II – urinal scale-up with microbial fuel cell scale-down for improved lighting. *J. Power Sources* 392, 150–158.
- Walter, X. A., Stinchcombe, A., Greenman, J. & Ieropoulos, I. (2016). Urine transduction to useable energy: a modular MFC approach for smartphone and remote system charging. *Appl. Energy* 4–10.
- Wetser, K., Sudirjo, E., Buisman, C. J. N. & Strik, D. P. B. T. B. (2015). Electricity generation by a plant microbial fuel cell with an integrated oxygen reducing biocathode. *Appl. Energy* 137, 151–157.
- Whitehead, D. C., Van der Meer, H.G, Ryden, J. C. & Ennik, G. C. (1986). Sources and transformations of organic nitrogen in intensively managed grassland soils. In: *Nitrogen Fluxes in Intensive Grassland Systems*, eds, Nijhoff, Dordrecht, pp 47–58.
- Wilsenach, J. A. & van Loosdrecht, M. C. (2004). Effects of separate urine collection on advanced nutrient removal processes. *Environ. Sci. Technol* 38, 1208–1215.
- You, J., Greenman, J., Melhuish, C. & Ieropoulos, I. (2016). Electricity generation and struvite recovery from human urine using microbial fuel cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 91, 647–654.
- Zang, G.-L., Sheng, G.-P., Li, W.-W., Tong, Z.-H., Zeng, R. J., Chen Shi, C. & Yu, H.-Q. (2012). Nutrient removal and energy production in a urine treatment process

using magnesium ammonium phosphate precipitation and a microbial fuel cell technique. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 1978–1984.

Zhang, J., Yuan, H., Abu-Reesh, I. M., He, Z. & Yuan, C. (2019b). Life Cycle Environmental Impact Comparison of Bioelectrochemical Systems for Wastewater Treatment. *Procedia CIRP* 80, 382–388.

Zhang, J., Yuan, H., Deng, Y., Abu-Reesh, I. M., He, Z. & Yuan, C. (2019a). Life cycle assessment of osmotic microbial fuel cells for simultaneous wastewater treatment and resource recovery. *Int J Life Cycle Assess.* [Doi.org/10.1007/s11367-019-01626-6](https://doi.org/10.1007/s11367-019-01626-6)

Zhang, J., Yuan, H., Deng, Y., Zha, Y., Abu-Reesh, I. M., He, Z. & Yuan, C. (2018). Life cycle assessment of a microbial desalination cell for sustainable wastewater treatment and saline water desalination. *J Clean Prod* 200, 900–910.

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) MEDIANTE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO

4.1. Introducción

Las tecnologías BES han sido diseñadas con el objetivo principal de producir energía amigable al medio ambiente. Debido a los daños irreversibles causados por el uso excesivo de los combustibles fósiles. Los BES como las celdas de combustibles microbiana (MFC) y las P-MFC son una tecnología emergente que han atraído la atención de los investigadores desde su implementación hasta la fecha debido a su sostenibilidad y bajo costo (Chouler *et al.*, 2016). Generalmente, una MFC consiste en una cámara anódica y una catódica separadas ambas por una membrana de intercambio de protones (PEM). El rol principal de la PEM es evitar que los electrolitos se migren de un compartimento a otro (Ho *et al.*, 2018). Recientemente, las MFC han sido usadas en diferentes campos como la remediación de metales pesados en las aguas residuales (Ho *et al.*, 2018; Daud *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021), en el suelo (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso de las MFC en el proceso de remediación de los metales pesados en las aguas residuales enfrentan grandes desafíos, según lo revisado por Ezziat *et al.* (2019). Otro desafío que enfrentan estos sistemas bioelectroquímicos es la toxicidad de las biopelículas. El proceso de remoción orgánica y de nutrientes se ha

reportado como una de las alternativas viables para resolver este problema (Rikmann *et al.*, 2018; Zekker *et al.*, 2021a, Zekker *et al.*, 2021b).

Por otro lado, las P-MFC son también derivados de los BES las cuales fueron desarrollados tanto para aumentar la eficiencia esta tecnología, así como también generar energía de manera continua (Strik *et al.* 2008). Al igual que las MFC, las P-MFC también tienen un compartimento anódico y un catódico. El objetivo principal de la de usar la planta sistema MFC, es que, en el proceso de fotosíntesis la planta libera exudados (Strik *et al.*, 2008; Helder *et al.*, 2012) que posteriormente son oxidados paulatinamente por las EAB (Helder *et al.*, 2010; Idris *et al.*, 2016) que se encuentren en la rizosfera. En un reciente artículo de revisión, se ha reportado que las EAB tienen un el rol crucial en el incremento de la generación de bioelectricidad usando P-MFC (Rusyn, 2021). En otro artículo de revisión, los autores reportaron el progreso y los avances recientes sobre la importancia de la fotosíntesis en los sistemas MFC (Apollon *et al.*, 2021). Además, Apollon *et al.* (2021) Presentaron un panorama tanto sobre la configuración de los BES, los tipos de materiales de electrodo, así como también los tipos de plantas que han sido utilizadas en las P-MFC.

Al menos, 40 especies de plantas han sido usadas en sistemas de P-MFC, según los revisado por Kabutey *et al.* (2019). Entre las especies de plantas usadas en P-MFC, se encuentran plantas vasculares, macrófitas (Kabutey *et al.*, 2020) y briofitas (Bombelli *et al.*, 2016), así como también las plantas *Spartina anglica* (Helder *et al.*, 2010; Helder *et al.*, 2010; Wetser *et al.*, 2017), *Glyceria maxima* (Strik *et al.*, 2008; Timmers *et al.*, 2013), *Sedum* spp. (Tapia *et al.*, 2017) y *Opuntia* spp. (Apollon *et al.*, 2020; Apollon *et al.*,

2022a). Densidades de potencia máxima entre los rangos de 10 mW m^{-2} a 12 mW m^{-2} fueron reportadas en novedosa Tubular P-MFC incrustada con *Glyceria maxima* (Timmers *et al.*, 2013). Posteriormente, Tubular P-MFC usada en campos de arroz mostró densidades de potencia entre 9.1 mW m^{-2} y 16.8 mW m^{-2} (Kumar *et al.*, 2020). En consecuencia, en una MFC de tipo sándwich (ST-MFC) configurada con un cátodo aireado por membrana, se logró mayor rendimiento de energía de 26680 mW m^{-2} (Taşkan, 2020).

Por otra parte, la evaluación del crecimiento de las plantas en sistemas P-MFC mientras producen energía ha sido poco investigada. Según la literatura, hay pocos trabajos infocando en el crecimiento de las plantas usando sistemas bioelectroquímicos. Además, la planta *Stevia rebaudiana* no se ha usado previamente en sistemas P-MFC. *Stevia rebaudiana* es una planta muy importante a nivel mundial debido a sus características particulares (Hossain *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el desempeño de P-MFC en términos de crecimiento de la planta y producción de energía. Además, se utilizaron por primera vez, hasta donde se sabe, P-MFC inoculadas con orina de diferentes animales domésticos. En este estudio también se evaluó el impacto de P-MFC en los parámetros morfológicos de las plantas. Además, la perspectiva futura de este estudio es desarrollar sistemas o tecnologías P-MFC de alta eficiencia que puedan aplicarse a gran escala a bajo costo utilizando materiales innovadores y naturales. Esta tecnología, que convierte la materia orgánica en energía almacenada a partir de P-MFC

inoculada con orina de animales domésticos utilizando EAB, puede ser una buena alternativa para su uso comercial.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Tratamientos evaluados

Se usó una P-MFC en forma cilíndrica que consistía en una membrana de arcilla (ver capítulo 2, con las siguientes características: diámetro de 9 cm, altura de 20 cm y espesor de 3 mm de espesor, respectivamente. Los reactores P-MFC construidos fueron utilizados en un estudio previo (Apollon *et al.*, 2022b). La Figura 4.1 muestra el establecimiento del experimento. Las plantas de *S. rebaudiana* se plantaron directamente en los reactores P-MFC con sus raíces colocadas en la superficie del ánodo, como se informó en un estudio anterior (Helder *et al.*, 2012). Los factores que se tomaron en cuenta durante el establecimiento del experimento fueron (a) tratamiento, (b) dosis y (c) tiempo. La Ecuación 4.1 representa el modelo lineal estadístico que se empleó en el presente experimento. En el experimento anterior, las mismas P-MFC fueron evaluadas, aplicando una dosis de 642,86 mL de orina de tres especies de animales domésticos (bovino, cabra y ovino). La cantidad de nutrientes reutilizados por los reactores y la generación de bioelectricidad fueron analizados (en el estudio previo).

Se evaluó el impacto de los reactores de P-MFC sobre el crecimiento de las plantas. Además, se correlacionó la relación entre la generación de energía y la cantidad de biomasa producida por la planta. Para la evaluación del crecimiento vegetal se utilizaron

los siguientes tratamientos: (a) Planta (testigo), (b) P-MFC-1 * (sin inocular), (c) P-MFC-2 (inoculada con orina de bovino), (d) P-MFC-3 (inoculada con orina de cabra) y (e) P-MFC-4 (inoculada con orina de oveja). Mientras que, para el experimento de producción de bioelectricidad (a) P-MFC-1 (sin inocular, control), (b) P-MFC-2 (inoculada con orina de vaca), (c) P-MFC-3 (inoculada con orina de cabra) y (d) P-MFC-4 (inoculado con orina de oveja) fueron evaluadas. El modelo estadístico que se ha utilizado en el experimento de generación de bioelectricidad se encuentra en el capítulo 3.



Figura 4.1. P-MFC instaladas y operadas durante el experimento.

La planta de Stevia fue elegida para ser utilizada en la tecnología P-MFC debido a su metabolismo fotosintético C_3 , así como a su gran importancia en términos de alimentos naturales. Esta planta es conocida como la única fuente natural de edulcorante no calórica, que es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. Stevia tiene una importancia relevante en cuanto a las condiciones de la sociedad actual, es decir, la demanda a nivel mundial se está moviendo hacia alimentos más saludables, y también una alternativa para combatir el aumento mundial de enfermedades causadas por

trastornos nutricionales; por ejemplo, *Diabetes mellitus* (Hossain *et al.*, 2017). El uso de P-MFC incrustada con Stevia es crucial para aumentar el rendimiento de la planta en cuanto a la de cantidad de biomasa producida, así como también, permite mejorar el rendimiento de producción de energía en P-MFC.

4.2.2. Etapas fisiológicas de la planta

4.2.2.1. Medición de los parámetros morfológicos de la planta

Se monitoreó el crecimiento de las plantas mensualmente: (i) midiendo la altura (cm) desde la parte superior del lecho de arena hasta la punta y (ii) contando el número de brotes (Papazoglou, 2007; Spencer *et al.*, 2006). Además, se midió el diámetro (cm) del tallo usando una cinta métrica. Posteriormente, una planta fue destruida por tratamiento, de la cual se determinaron los siguientes parámetros: a) longitud de raíces en cm (Fig. 4.2a) y b) número de raíces por planta (Fig. 4.2b). Este proceso se repitió cada 60 días durante un período de seis meses. Se calculó la desviación estándar a partir de los datos obtenidos. La Ecuación 4.1 representa el modelo estadístico utilizado en el experimento antemencionado.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + T_k + (TD)_{ij} + (TT)_{ik} + (DT)_{jk} + (TDT)_{ijk} + E_{ijk} \quad (4.1)$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable de respuesta.

μ = Media general.

T_i = efecto del i-ésimo tratamiento.

D_j = efecto del j-ésimo dosis.

T_k = efecto del k-ésimo tiempo.

$(TD)_{ij}$ = efecto de la interacción de i-ésimo tratamientos y j-ésimo dosis.

$(Tt)_{ik}$ = efecto de la interacción de i-ésimo tratamiento y k-ésimo tiempo.

$(Dt)_{jk}$ = efecto de la interacción j-ésimo dosis y k-ésimo tiempo.

$(TDt)_{ijk}$ = efecto de la interacción triple.

E_{ijk} = Error experimental.



Figura 4.2. Medición de (a) longitud de raíces y (b) conteo de número de raíces por planta.

4.2.3. Mediciones de bioelectricidad

De acuerdo con los resultados obtenidos de las curvas de polarización en el experimento anterior, el ánodo y cátodo se conectaron con una resistencia de 1000Ω (Apollon *et al.*,

2022b). El voltaje de circuito cerrado (CCV, por sus siglas en inglés) fue monitoreado en un intervalo de tiempo de 15 min /dato, mediante el uso de un sistema de adquisición automática basado en un microcontrolador (Arduino, 2560 Mega) conectado a una computadora durante 30 días. Las densidades de corriente y potencia se calcularon considerando el área (0.0693 m²) de la superficie del ánodo del reactor P-MFC.

4.2.4. Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico de Minitab (versión 19). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), posteriormente se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para la comparación de medias. Se utilizó GraphPad Prism, Versión 9.0.1 (1 5 1) para graficar los datos de bioelectricidad.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Monitoreo del crecimiento de las plantas

En este estudio, el factor de tratamiento (incluido el factor de dosis de orina) generó resultados estadísticamente significativos en cuanto a la altura de la planta. Se puede observar que los tratamientos P-MFC-3 y P-MFC-4 resultaron ser iguales y alcanzaron mayor altura con valores de 49.13 ± 0.02 and 50.08 ± 0.67 cm, respectivamente (Figura 4.3a), mientras que la P-MFC-2 resultó ser mejor que la P-MFC-1*. Sin embargo, el valor de altura más bajo lo alcanzó el tratamiento testigo. Además, la P-MFC inoculada con los tres tipos de orina actuó positivamente en la morfología de la planta. Además, no

hubo diferencias significativas para el factor tiempo, ni para los factores doble y triple. Lo anterior comprobó que las interacciones entre los factores mencionados anteriormente no son una opción para aumentar el rendimiento de la altura de la planta.

La Figura 4.3b representa el número de brotes obtenidos en *S. rebaudiana*. Se puede observar que P-MFC-1* logró un mayor número de brotes (28.06) en comparación con las otras P-MFC, incluido el control, mientras que P-MFC-3 (inoculada con orina de cabra) logró el mayor diámetro (0.52 ± 0.01 cm) con respecto a los demás tratamientos evaluados (Figura 4.3c). La literatura reportó que el sistema MFC favorece el crecimiento de las plantas (Helder *et al.*, 2010). Esta afirmación fue verificada en este estudio. Por lo tanto, el reactor P-MFC-1* no recibió ninguna dosis de orina de animales domésticos. El estudio de Helder y colaboradores difiere de este estudio; estos autores utilizaron otro tipo de tratamiento, por ejemplo, la solución de Hoagland desarrollada con la función principal de acelerar el crecimiento de las plantas, así como la forma en que los autores evaluaron los parámetros de crecimiento de las plantas. En otros estudios el comportamiento morfológico de cuatro especies de *Opuntia* en P-MFC (en un ambiente semidesértico) fue evaluado aplicando a las P-MFC 1 L de agua (Apollon *et al.*, 2020) y 150 mg L^{-1} de nitrato de amonio (Apollon *et al.*, 2022a) por semana durante 30 días, respectivamente. Los resultados revelaron que el crecimiento de las plantas aumentó significativamente en presencia de las P-MFC. Sin embargo, cuando se aplicó nitrato de amonio, hubo una mejora sustancial (51.97 %) en el parámetro altura de la planta. En otros estudios, los investigadores han observado que las plantas cultivadas en P-MFC (inoculadas con fertilizante) tuvieron un crecimiento significativo (longitud de la planta) en comparación con el control (sin inocular) (Haile y Ayalew, 2018; Chaka *et al.*, 2020;

Arulmani *et al.* , 2021). El mismo fenómeno se observó en este estudio. De acuerdo con lo anterior, se puede argumentar que tanto la P-MFC como la adición de fertilizantes son factores claves que influyen en el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, el factor tratamiento produjo resultados estadísticamente significativos en la longitud de raíz de *S. rebaudiana*. Los mejores tratamientos fueron P-MFC-1* y P-MFC-2, que arrojaron longitudes de raíces promedio de 17.43 ± 1.06 y 16.67 ± 0.95 cm, respectivamente (Figura 4.4a), seguidos de la P-MFC-3 que logró una mayor longitud de raíz con respecto al testigo y P-MFC-4. Para el número de raíces, el mejor tratamiento fue P-MFC-2, logrando la media más alta de 86 ± 2.50 (Figura 4.4b), mientras que la P-MFC-1* y P-MFC-4 resultaron ser iguales. El tratamiento testigo mostró el menor número de raíces en este estudio. Cabe destacar que se observó un aumento (55%) de los parámetros planta-raíz. Por lo tanto, se encontró que las raíces de las plantas eran permeables en este estudio. En consecuencia, esto fue un buen indicador en el proceso de rizodeposición de la planta (Helder *et al.*, 2012). Por lo tanto, el crecimiento de las raíces influyó en el rendimiento de la producción de biomasa foliar. Además, la aplicación de las orinas como inoculantes en el sistema de P-MFC afectó positivamente el comportamiento morfológico de la planta.

En estudios anteriores, los investigadores informaron rendimientos de biomasa de 33 kg m^{-2} y $1,1 \text{ kg m}^{-2}$, respectivamente, usando la planta *Arundinella anomala* (Helder *et al.*, 2010; Luo, 2009), de 0.48 a 6 kg m^{-2} evaluando *Spartina anglica* (Swales *et al.*, 2004; Helder *et al.*, 2010), y 3.8 - 23 kg m^{-2} en *Arendo donax* (Angelini *et al.*, 2008; Helder *et al.*, 2010). En este estudio, la cantidad de biomasa en kg m^{-2} no fue tomada en consideración

debido a que no estuvo contemplada. Sin embargo, solo el número de brotes en cada tratamiento se contó como el principal índice de producción de biomasa. Comparando los resultados previos obtenidos en la literatura con los encontrados en este estudio, no hay duda de que los sistemas bioelectroquímicos como la P-MFC son tecnologías que podrían implementarse en la agricultura moderna, ya que estos sistemas tienen funciones como 1) producción de bioelectricidad, 2) aceleración del proceso de mineralización (debido a la gran actividad bacteriana), y 3) aumento de la cantidad de biomasa producida por las plantas, etc.

Considerando lo anterior, se puede argumentar que existe una relación proporcional entre los parámetros morfológicos de la planta y los reactores P-MFC utilizados en este estudio. El crecimiento de las plantas también depende de otros factores, como (a) la actividad de los microbios en el proceso de mineralización, (b) el tipo de sustrato, (c) el porcentaje de MO en el sustrato y (d) la disponibilidad de nutrientes en el sustrato. Además, el pH neutro del sustrato utilizado en el estudio fue uno de los indicadores del crecimiento de las plantas, como se informó en otro lugar (Helder *et al.*, 2012; Koretsky *et al.*, 2008). Otra explicación que se puede dar es que las raíces de las plantas son el principal sitio de crecimiento de los microorganismos que están presentes en la rizósfera; los cuales se denominan “rizobacterias”. Numerosos microorganismos vivos afectan positivamente el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes (Yadav *et al.*, 2021). Muchos de estos microorganismos son bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) (Lu *et al.*, 2018; Inthama *et al.*, 2021).

Las especies de plantas como *Artemisa annua* tienden a atraer abundantes comunidades de microorganismos específicos asociados con la raíz de la planta, como se ha

demostrado por Shi *et al.* (2022) en su trabajo más reciente. Se ha informado una amplia diversidad de PGPB en el suelo, incluidos *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Fan *et al.*, 2017; M.K. Hasan *et al.*, 2019; Disi *et al.*, 2019). En un artículo de revisión de Olanrewaju *et al.* (2017), los autores informaron que las PGPB influyen en el crecimiento de las plantas por vías directas a través de la fijación de nitrógeno y la solubilización de fósforo, así como a través de la producción de *auxina*, *giberelina* y *citoquinina*.

Además, en un estudio de Jarma-Orozco *et al.* (2020) que evaluó el efecto de niveles bajos y altos de radiación sobre las principales tasas de crecimiento de *Stevia*, se observó que la radiación solar era un factor que podía influir en el crecimiento de la planta (*Stevia*). Se descubrió que la fotosíntesis puede alcanzar un punto de saturación de luz cercano a los 1200 μmol (radiación fotosintéticamente activa [PAR, por sus siglas en inglés] $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este fue un buen indicador para evaluar los parámetros de crecimiento de las plantas. En investigaciones anteriores se ha demostrado que el pH y la disponibilidad de nutrientes son otros factores que influyen en la cantidad de biomasa foliar de *S. rebaudiana* en condiciones hidropónicas (Kafle *et al.*, 2017). Sin embargo, los autores recomendaron evaluar la misma planta en un experimento de campo abierto para confirmar el fenómeno observado. Posteriormente, en un estudio realizado por Mahajan *et al.* (2020), la aplicación de KNO_3 por vía foliar como modulador del rendimiento de biomasa y absorción de nutrientes para *S. rebaudiana* fue reportada como una buena opción para incrementar el crecimiento de la planta. Una concentración moderada de sales influye tanto en el crecimiento como en el rendimiento de biomasa seca de hojas (Mahajan *et al.*, 2020). En general, se puede argumentar que aumentar la cantidad de

biomasa producida por *S. rebaudiana* es crucial para las industrias que procesan este tipo de plantas. Por ejemplo, aumentar la cantidad de biomasa actualmente es incrementar la producción del sustituto del azúcar para satisfacer la alta demanda mundial de este producto.

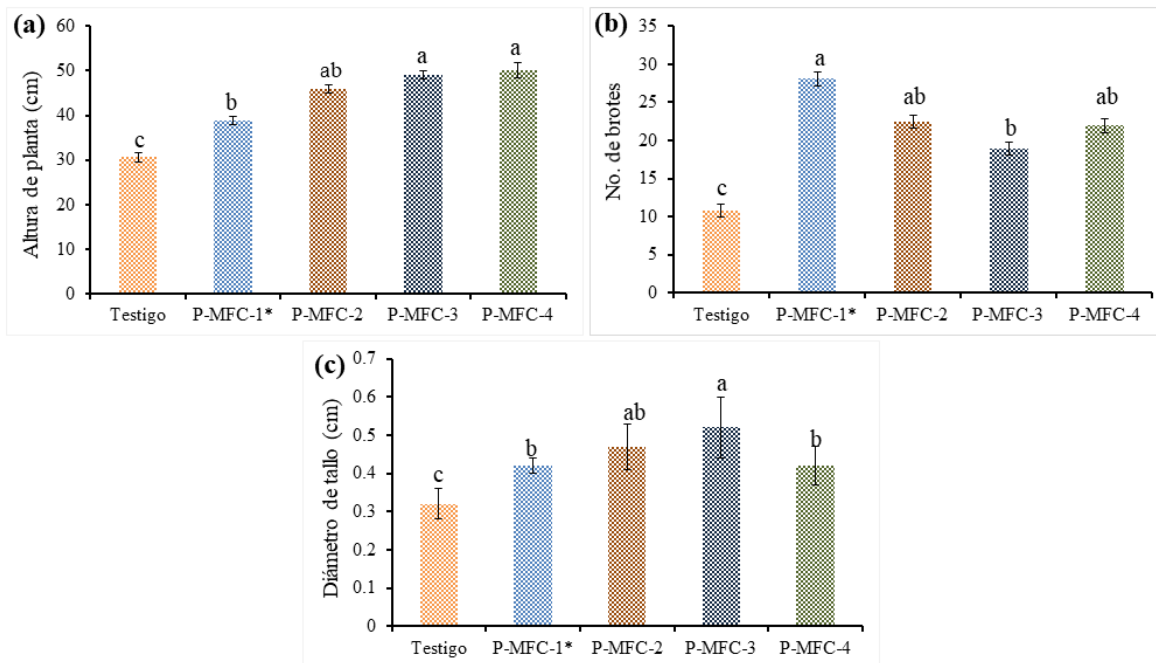


Figura 4.3. Efecto de las P-MFC sobre los parámetros de crecimiento de *S. rebaudiana*: (a) altura de la planta (cm); (b) número de brotes, y (c) diámetro del tallo (cm). Medias con la misma letra para cada figura son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

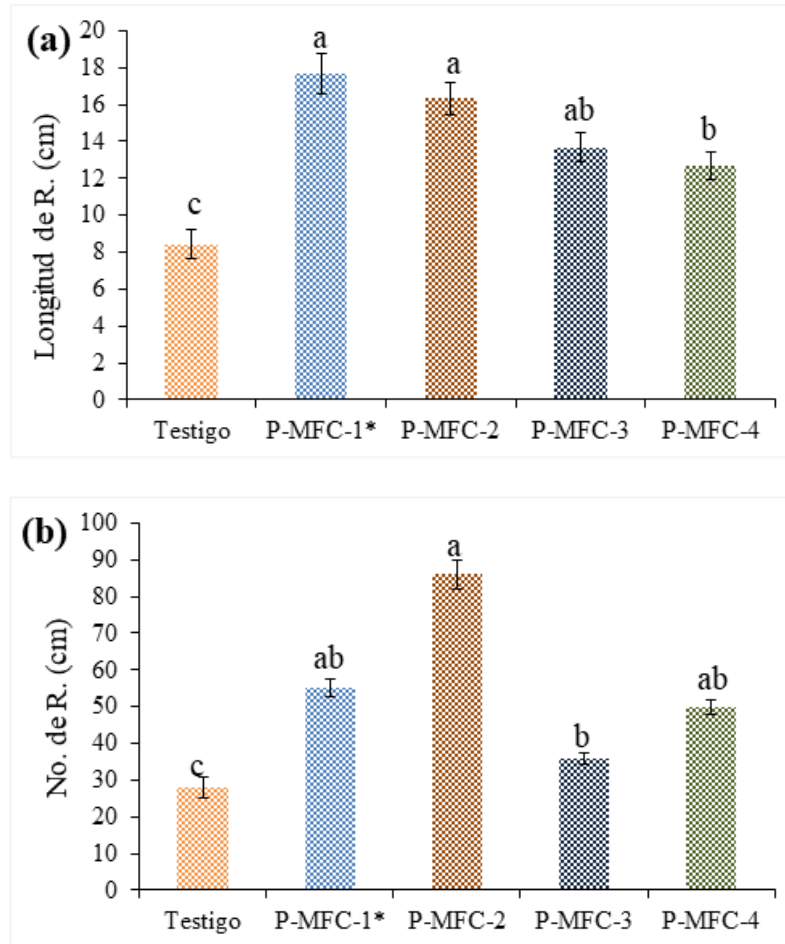


Figura 4.4. Impacto de las P-MFC en la rizósfera de *S. rebaudiana*: (a) longitud de la raíz (cm), y (b) número de raíces. Medias con la misma letra para cada figura son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$). R – Raíces.

4.3.2. Operación a largo plazo en los reactores P-MFC

Los resultados muestran que todos reactores P-MFC produjeron bioelectricidad durante 30 días de operación. Durante el experimento, la temperatura media fue 18.5 °C (Max. 25.6 °C y Min. 11.6 °C); y la precipitación fue de 40.4 mm (según la base de datos del 2021 de CONAGUA, México). De acuerdo con el estudio previo, el sustrato utilizado tenía

las siguientes características: pH 7.56; conductividad eléctrica (CE) de 1.42 mS cm⁻¹; MO de 5.60; NO₃⁻ de 194.828 mg L⁻¹; PO₄³⁻-P de 8.813 mg L⁻¹; K de 70.025 mg L⁻¹ y capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 14.76 meq/100 g de suelo (Apollon *et al.*, 2022b).

Como se puede observar, la densidad de potencia máxima más alta de 43.68 mW m⁻² fue generada en la P-MFC-2 (Figura. 4.5a). Este valor fue logrado el día 2 y fue constante casi todos los demás días de operación del reactor. Sin embargo, se observó una disminución entre los días 3-10, y el día 11 la generación de energía disminuyó a 95.71% (de 43.68 a 1.87 mW m⁻²). Este comportamiento de la generación de bioelectricidad se debe a una falla de los canales que enviaron la señal al sistema automático de monitoreo de voltaje durante este periodo. Este suceso solo se registró en el reactor P-MFC-2. Otro factor que podría atribuirse a la baja producción de energía fue la falta de humedad en el reactor. Un fenómeno similar también fue demostrado en otro estudio usando P-MFC embebida con *Spartina anglica* (Sudirjo *et al.*, 2019). Sudirjo y colaboradores observaron que cuando el compartimento del ánodo estuvo seco, la producción de bioelectricidad tendía a ser cero. Posteriormente, el día 16 se obtuvo un incremento de 9.22% (2.06 mW m⁻²) hasta el día 20. Del día 21 a 24 el reactor mostró una producción de bioelectricidad constante, y luego presentó un comportamiento diferente hasta el día 30. La corriente de salida obtenida en la P-MFC-2 fue 25 mA m⁻². La Figura 4.6a indica el comportamiento de la corriente en la P-MFC-2 durante los 30 días de operación. El pico máximo de corriente (1.74 mA) se produjo el día 16; y el voltaje máximo en circuito cerrado alcanzado para ese periodo fue 1730 mV.

La Figura 4.5b muestra la generación de bioelectricidad en la P-MFC-1* (* sin inocular). Como se puede ver, el pico más alto de densidad de potencia se generó el día 16 alcanzando un valor de 6.28 mW m^{-2} , para una densidad de corriente de 9.37 mA m^{-2} . Pevio a la obtención de este rendimiento, se había alcanzado un valor de 2.79 mW m^{-2} en la P-MFC-1* (el día 1 de arranque del sistema). El incremento de la producción de energía en este reactor osciló a 55.57%, sin embargo, se observó una disminución del días 17 hasta el día 28. La P-MFC-1* es el segundo reactor en este estudio que presentó mayor rendimiento en términos de generación de energía. Seguido por la P-MFC-3 (Figura 4.5c) logrando una densidad de potencia de 6.09 mW m^{-2} (el día 15), para una densidad de corriente de 9.73 mA m^{-2} . La P-MFC-3 mostró una disminución de producción de energía los día 7, 8, y 17 al 29 durante el estudio. Entre la P-MFC-1* y P-MFC-3 no hubo diferencias estadísticas significativas. Figura 4.6b y Figura 4.6c muestran el monitoreo de la corriente en los reactores P-MFC1* y P-MFC-3, respectivamente. Los picos más altos de salida de corriente logrados en P-MFC-1* y P-MFC-3 fueron 0.66 mA (660 mV) y 0.65 mA (650 mV), respectivamente. Mientras que la P-MFC-4 (Figura 4.5d) alcanzó una densidad de potencia de 4.85 mW m^{-2} . Este valor fue generado el día 16 de operación del reactor. Sin embargo, del día 17 al día 29 se puede ver que la producción de energía disminuyó (60%). Se mostró un incremento de 90% entre los días 29 y 30. En la P-MFC-4 se obtuvo una corriente de 0.58 mA (Figura 4.6d) con un voltaje en circuito cerrado de 580 mV .

Por otro lado, el valor mínimo de generación de bioelectricidad lo presentó el control (Figuras 4.5e y 4.6e), alcanzando una densidad de potencia de 3.46 mW m^{-2} (8.08 mA m^{-2}). En estudios anteriores, también se reportaron valores más bajos en MFC usados

con control vs P-MFC (Sathish-Kumar *et al.*, 2019; Apollon *et al.*, 2020; Apollon *et al.*, 2022a). Esa baja generación de bioelectricidad en el control podría atribuirse a factor como bajo contenido de MO, el cual influye en la actividad de la comunidad bacteriana en la superficie del electrodo de ánodo. Una baja actividad de microorganismos en el entorno del sistema bioelectroquímico ocasiona una disminución total de producción de bioelectricidad. Es la explicación que se podría dar al respecto de este fenómeno.

Los resultados encontrados en este estudio fueron más altos en comparación con los reportados por Sudirjo *et al.* (2019) en una P-MFC operada con carbón activado mezclado con sedimentos marinos como material del ánodo. La densidad de potencia reportada en esta P-MFC (embebida con *Spartina anglica*) fue 1.04 mW m^{-2} (durante un periodo de dos semanas), la cual fue 42 veces más baja en relación con la P-MFC-2, 6 veces menor que la P-MFC-1*, 5 veces menor que la P-MFC-3, 4 veces más baja que la P-MFC-4 y 3 veces menor que el control. Aunque el control resultó ser más bajo en este estudio, fue mayor que lo reportado por Sudirjo *et al.* En un estudio reciente, se usaron especies de plantas como *Amaranthus viridis* y *Triticum aestivum* mediadas por P-MFC para la generación de bioelectricidad asociada por la actividad bacteriana en el ánodo (Arulmani *et al.*, 2021). Arulmani *et al.* Hallaron una densidad de potencia más alta de 194.45 mW m^{-2} durante un experimento de polarización individual, a diferencia de este estudio que reportó sólo el rendimiento de bioelectricidad en circuito cerrado. Ellos atribuyeron la salida de potencia a la actividad de los microorganismos presentes en la superficie del ánodo. En otros experimentos de polarización se reportaron densidades de potencia de 371.34 mW m^{-2} (Sharma y Chhabra, 2021) y 1465 mW m^{-2} (Kaur *et al.*, 2021), en *Chlamydomonas reinhardtii* P-MFC y MFC con electrodos de zinc-carbono

(inoculado con estiércol de ganado), respectivamente. Estos resultados fueron también superiores a los encontrados en esta investigación. En otro estudio reciente, se reportaron rendimientos de generación de voltaje de $137.12 \text{ mV} \pm 13.08$ y 350.50 ± 74.89 mV, en *Typha orientalis* (españada) P-MFC y *Oryza rufipogon* (arroz) P-MFC, respectivamente, bajo circuito abierto y cerrado durante un periodo de 150 días (Tongphanpharn *et al.*, 2021). Estos resultados fueron más bajos en comparación con lo reportado en este trabajo. Esto indica que la P-MFC operada con *Stevia rebaudiana* tiene un gran potencial para generar bioelectricidad con relación a las especies de plantas antes mencionadas. Cabe mencionar que los reactores P-MFC usados en este estudio fueron operados previamente por más de 180 días. Durante este periodo los parámetros de crecimiento de la planta y la generación de bioelectricidad (por 43 días) fueron monitoreados (Apollon *et al.*, 2022b). Por eso, se registró una producción de energía menor en todos los reactores en comparación a la reportada en el estudio anterior.

De acuerdo con lo anterior, se puede argumentar que el rendimiento de la P-MFC depende de varios factores como (i) la tasa de crecimiento bacteriano en el ánodo (Harshitha *et al.*, 2019), (ii) formación de biopelículas en la superficie del ánodo gracias a la actividad de los microbios (Hassan *et al.*, 2019) y (iii) la descomposición (oxidación) de la materia orgánica por los microbios presentes en la superficie del ánodo (Yaqoob *et al.*, 2021). La gran efectividad de los microorganismos depende de factores como el pH, temperatura y tipos de tratamientos o nutrientes aplicados en los reactores (Harshitha *et al.*, 2019). Otros factores que influyen en la generación de bioelectricidad con P-MFC son la radiación solar (Moqsud *et al.*, 2015), tipos de plantas (es decir, tipos de vías metabólicas C₃, C₄ y CAM), tiempo de monitoreo, condición de operación (e.g., ambiente

controlado o nocontrolado), tipos de materiales de electrodos utilizados y tamaño del reactor utilizado (Sudirjo *et al.*, 2019).

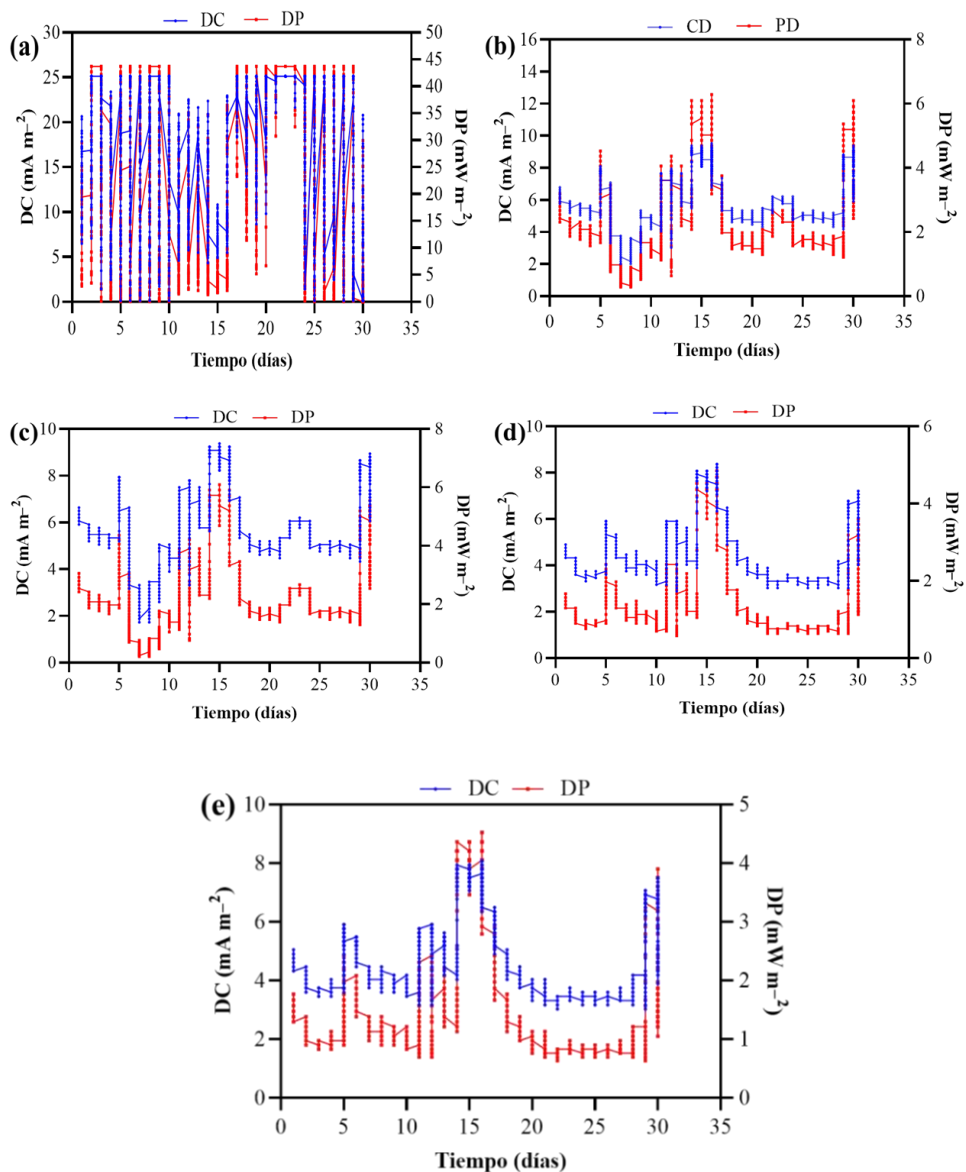


Figura 4.5. Curvas de densidad de corriente y densidad de potencia en las (a) P-MFC-2, (b) P-MFC-1*, (c) P-MFC-3, (d) P-MFC-4 y (e) el testigo, durante 30 días. DC – Densidad de corriente; DP – Densidad de potencia.

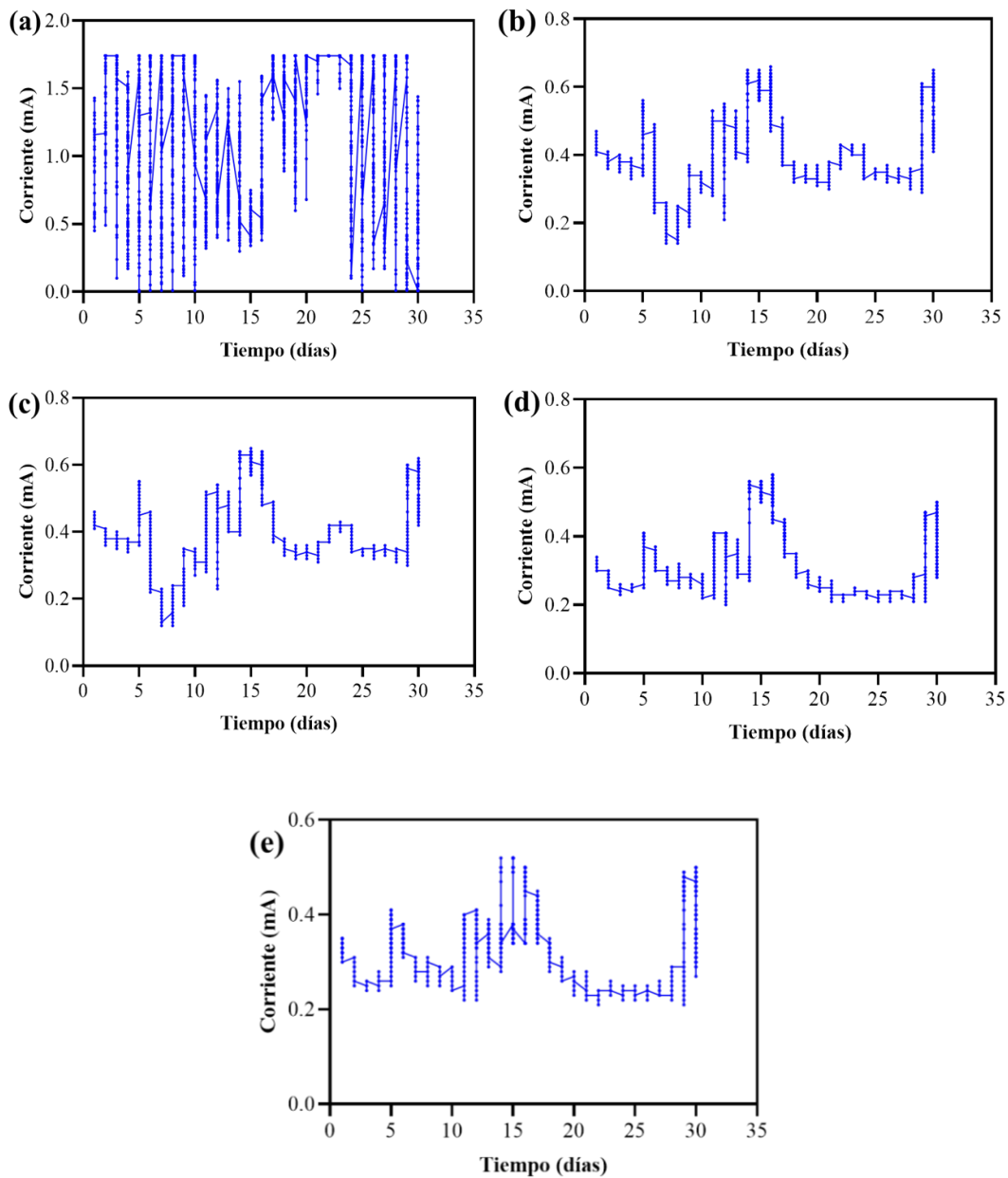


Figura 4.6. Valores de corriente obtenidos durante 30 días de monitoreo de los reactores (a) P-MFC-2, (b) P-MFC-1*, (c) P-MFC-3, (d) P-MFC-4 y (e) el testigo.

4.3.3. Relación entre la generación de energía y el crecimiento de la planta

Los resultados de la generación de potencia se muestran en la Figura 4.7. Se puede observar que el pico más alto fue logrado en la P-MFC-4, que previamente había sido inoculada con una dosis de 642.86 mL de orina de oveja. La potencia de salida hallada en este reactor P-MFC fue 3.02 mW. Seguido por los reactores P-MF-1* (0.43 mW), P-MFC-2 (0.33 mW) y P-MFC-3 (0.42 mW), respectivamente. Para la evaluación del impacto de la generación de potencia sobre la altura de planta, se puede deducir que ésta influyó en este parámetro durante el estudio. En contraste con estudios previos donde la planta control resultó ser menor en términos de altura (Apollon *et al.*, 2020; Apollon *et al.*, 2022^a). Además, la generación de potencia tuvo un efecto significativo en el número de raíces, así como en la longitud de raíces. De acuerdo Arulmani *et al.*, las raíces de las plantas tienen un crecimiento más profundo en el compartimento del ánodo (Arulmani *et al.*, 2021). Esto se ha confirmado en este estudio. Además, todas las plantas crecieron en las P-MFC. El mismo fenómeno fue observado por Sudirjo *et al.*, (2019). También, se puede argumentar que el ánodo tuvo un efecto significativo en el proceso de desarrollo de la planta, debido a que la presencia del ánodo en la rizosfera de la planta atrae a los microorganismos que participan en el proceso de fijación de nitrógeno para la planta. También, la CE es un factor clave en la absorción de nutrientes por las plantas.

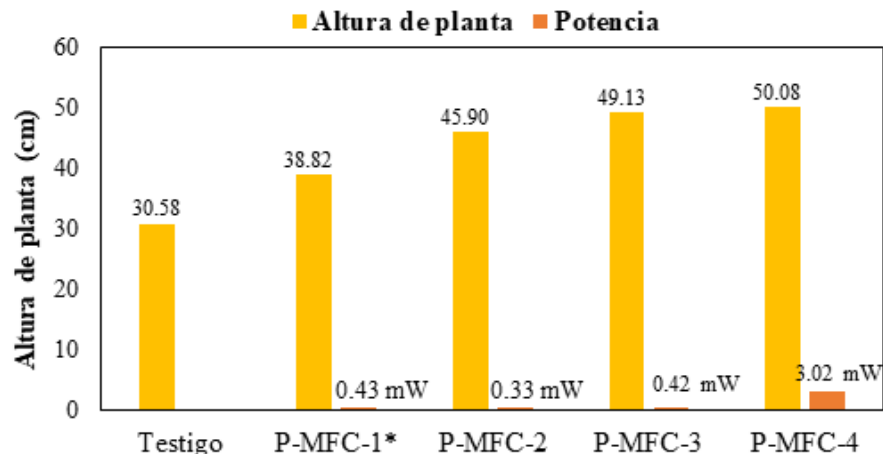


Figura 4.7. Altura de planta vs generación de energía en los P-MFC evaluados.

4.4. Conclusiones

Este estudio evaluó tanto el crecimiento de *Stevia rebaudiana*, así como la generación de bioelectricidad usando P-MFC previamente operados en experimento previo. Los resultados indicaron que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sistemas P-MFC evaluados, los cuales influyeron positivamente sobre el crecimiento de la planta. Las P-MFC inoculadas con orina de cabra y de oveja presentaron mayor altura en estudio (49.13 ± 0.02 y 50.08 ± 0.67 cm, respectivamente) en comparación a las otras P-MFC evaluadas. Sin embargo, para el diámetro de tallo la P-MFC-3 (inoculada con orina de caprino) obtuvo el mayor diámetro (0.52 ± 0.01 cm). La P-MFC-2 (inoculada con orina de bovino) alcanzó mayor número de raíces (86 ± 2.50). La salida de potencia más alta fue lograda en la P-MFC-4 con un valor de 3.02 mW (1.74 mA). Siendo el mejor reactor en este estudio. En términos de generación de bioelectricidad a largo plazo, la P-MFC-2 mostró mayor densidad de potencia máxima con un valor de 43.68 mW m^{-2} , y una densidad de corriente 25 mA m^{-2} . La densidad de potencia incrementó de 2% en relación

con el estudio previo. En general, este estudio demostró que la P-MFC embebida con *Stevia rebaudiana* es una buena opción tanto para aumentar la cantidad de biomasa de la planta, así como también incrementar el rendimiento de generación de energía. Sin embargo, más estudios son requeridos en términos de tipos de material de configuración, tipos de planta, tipos de sustrato, etc., para llevar a cabo la aplicación de estas tecnologías en tiempo real y a gran escala.

Referencias

- Angelini, L.G., Ceccarini, L., Nassi o Di Nasso, N. & Bonari, E. (2008). Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass Bioenergy*, 33(4), 635–643.
- Apollon, W., Kamaraj, S. K., Silos-Espino, H., Perales-Segovia, C., Valera-Montero, L. L., Maldonado-Ruelas, V. A., ... Gómez-Leyva, J. F. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: Demonstration of their applications. *Appl Energy*, 279, 115788.
- Apollon, W., Luna-Maldonado, A. I., Kamaraj, S. K., Vidales-Contreras, J. A., Rodríguez-Fuentes, H., Gómez-Leyva, J. F., et al. (2021). Progress and recent trends in photosynthetic assisted microbial fuel cells: A review. *Biomass Bioenergy* 148, 106028.
- Apollon, W., Valera-Montero, L. L., Perales-Segovia, C., Maldonado-Ruelas, V. A., Ortiz-Medina, R. A., Gómez-Leyva, J. F., ... Kamaraj, S. K. (2022a). Effect of ammonium nitrate on novel cactus pear genotypes aided by biobattery in a semi-arid ecosystem. *Sustain. Energy Technol. Assess*, 49, 101730.
- Apollon, W., Luna-Maldonado, A.I., Kamaraj, S.-K., Vidales-Contreras, J.A., Rodríguez-Fuentes, H., Gómez-Leyva, J.F., Maldonado-Ruelas, V.A. & Ortiz-Medina, R.A. (2022b). Self-Sustainable Nutrients Reutilization Associated to Electricity Generation from Plant Microbial Fuel Cells. SETA-D-22-00449, Available at SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4032234>
- Arulmani, S. R. B., Gnanamuthu, H. L., Kandasamy, S., Govindarajan, G., Alsehli, M., Elfasakhany, A., ... Zhang, H. (2021). Sustainable bioelectricity production from *Amaranthus viridis* and *Triticum aestivum* mediated plant microbial fuel cells with efficient electrogenic bacteria selections. *Process Biochem*, 107, 27–37.
- Bombelli, P., Dennis, R. J., Felder, F., Cooper, M. B., Madras Rajaraman Iyer, D., Royles, J., Harrison, S. T., Smith, A. G., Harrison, C. J., & Howe, C. J. (2016). Electrical

- output of bryophyte microbial fuel cell systems is sufficient to power a radio or an environmental sensor. *R. Soc. Open Sci.*, 3(10), 160249.
- Chaka, B.A., Osano, A.M., Maghanga, J.M., & Magu, M.M. (2020). Optimization of bioslurry-available plant nutrients using *T. brownii* and *Acanthaceae* spp. *Biocatalysts*. *Adv. Agric.*, 2020, 1–12.
- Chouler, J., Padgett, G. A., Cameron, P. J., Preuss, K., Titirici, M. M., Ieropoulos, I., et al. (2016). Towards effective small scale microbial fuel cells for energy generation from urine. *Electrochim. Acta* 192, 89–98.
- Daud, N.N.M., Ahmad, A., Yaqoob, A.A. & Mohamad-Ibrahim, M.N. (2021). Application of rotten rice as a substrate for bacterial species to generate energy and the removal of toxic metals from wastewater through microbial fuel cells. *Environ Sci Pollut Res* 28, 62816–62827.
- Disi, J. O., Mohammad, H. K., Lawrence, K., Kloepper, J., Fadamiro, H. (2019). A soil bacterium can shape belowground interactions between maize, herbivores and entomopathogenic nematodes. *Plant Soil* 437, 83–92.
- Ezziat, L., Elabed, A., Ibsouda, S., & El Abed, S. (2019). Challenges of Microbial Fuel Cell Architecture on Heavy Metal Recovery and Removal From Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00001>
- Fan, K., Weisenhorn, P., Gilbert, J. A., & Chu, H. (2018) Wheat rhizosphere harbors a less complex and more stable microbial co-occurrence pattern than bulk soil. *Soil Biol. Biochem.* 125, 251–260.
- Haile, A., & Ayalew, T. W. (2018). Comparative study on the effect of bio-slurry and inorganic N-fertilizer on growth and yield of kale (*Brassica oleracea* L.). *Afr. J. Plant Sci.*, 12, 81-87.
- Harshitha, G., Sahoo, A. & Sethy, R. (2019). Bioelectricity generation from different biomass feed at anode chamber and to study process parameters in microbial fuel cells. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 20, 101191.

- Hassan, S.H., Zohri, A.E.N.A. & Kassim, R.M. (2019). Electricity generation from sugarcane molasses using microbial fuel cell technologies. *Energy*, 178, 538–543.
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., Jones, J., Shantharaj, D., Liles, M. R., & Kloepper, J. W. (2019) Pectin-rich amendment enhances soybean growth promotion and nodulation mediated by *Bacillus velezensis* strains. *Plants* 8, 120.
- Helder, M., Strik, D. P. B. T. B., Hamelers, H. V. M., Kuhn, A. J., Blok, C., & Buisman, C. J. N. (2010). Concurrent bio-electricity and biomass production in three Plant-Microbial Fuel Cells using *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* and *Arundo donax*. *Bioresour Technol*, 101(10), 3541–3547.
- Helder, M., Strik, D. P. B. T. B., Hamelers, H. V. M., Kuijken, R. C. P., & Buisman, C. J. N. (2012). New plant-growth medium for increased power output of the Plant-Microbial Fuel Cell. *Bioresour Technol*, 104, 417–423.
- Helder, M., Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Kuhn, A.J., Blok, C., Buisman, C.J.N. (2010). Concurrent bioelectricity and biomass production in three Plant-Microbial Fuel Cells using *Spartina anglica*, *Arundinella anomala* and *Arundo donax*. *Bioresour. Technol*, 101, 3541–3547.
- Ho, N. A. D., Babel, S., & Sombatmankhong, K. (2018). Bio-electrochemical system for recovery of silver coupled with power generation and wastewater treatment from silver(I) diammine complex. *J. Water Process. Eng*, 23, 186–194.
- Hossain, M. F., Islam, M. T., Islam, M. A. & Akhtar, S. (2017) Cultivation and uses of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *African J. Food, Agric. Nutr. Dev.* 17(4), 12745–12757.
- INEGI (2017). Anuario estadístico y geográfico de Nuevo León. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Gobierno del Estado de Nuevo León. 614 p. https://www.datatur.sectur.gob.mx/ltxEF_Docs/NL_ANUARIO_PDF.pdf
- Inthama, P., Pumas, P., Pekkoh, J., Pathom-aree, W., & Pumas, C. (2021). Plant growth and drought tolerance-promoting bacterium for bioremediation of Paraquat pesticide residues in agriculture soils. *Front. Microbiol.* 12, 604662.

- Jarma-Orozco, A., Combatt-Caballero, E., & Jaraba-Navas, J. (2020). Growth and development of *Stevia rebaudiana* Bert., in high and low levels of radiation. *Curr Plant Biol*, 22, 100144.
- Jarma-Orozco, A., Combatt-Caballero, E., & Jaraba-Navas, J. (2020). Growth and development of *Stevia rebaudiana* Bert., in high and low levels of radiation. *Curre Plant Biol*, 22, 100144.
- Kabutey, F. T., Ding, J., Zhao, Q., Antwi, P., & Quashie, F. K. (2020). Electrical current generation from a continuous flow macrophyte biocathode sediment microbial fuel cell (mSMFC) during the degradation of pollutants in urban river sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 27, 35364–35380.
- Kabutey, F. T., Zhao, Q., Wei, L., Ding, J., Antwi, P., Quashie, F. K., & Wang, W. (2019). An overview of plant microbial fuel cells (PMFC): Configurations and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev*, 110, 402-414.
- Kafle, G. G., Midmore, D. J., & Gautam, R. (2017). Effect of nutrient omission and pH on the biomass and concentration and content of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) under hydroponic conditions. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 7, 136–142.
- Kaur, G., Brar, Y.S., Kaur, J., Gupta, A., Sharma, K.K., ...Nima Khalilpoor, N. (2021). Management of Cattle Dung and Novel Bioelectricity Generation Using Microbial Fuel Cells: An Ingenious Experimental Approach. *Int. J. Chem Eng*, 2021,10.<https://doi.org/10.1155/2021/5536221>
- Koretsky, C. M., Haveman, M., Cuellar, A., Beuving, L., Shattuck, T., & Wagner, M. (2008). Influence of *Spartina* and *Juncus* on Saltmarsh Sediments. I. Pore Water Geochemistry. *Chem Geol*, 255, 87–99.
- Kumar, V.K., Man mohan, K., Sreelakshmi, P.M., Manju, P. & Gajalakshmi, S. (2020). Resource recovery from paddy field using plant microbial fuel cell. *Process Biochem*, 99, 270–281.

- Lu, T., Ke, M., Lavoie, M., Jin, Y., Fan, X., Zhang, Z., Fu, Z., Sun, L., Gillings, M., Peñuelas, J. et al (2018) Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. *Microbiome* 6, 1–12.
- Luo, F.L. (2009). Personal Communication. Research Center Jülich, ICG-3, Jülich, Germany.
- Mahajan, M., Sharma, S., Kumar, P., & Pal, P. K. (2020). Foliar application of KNO_3 modulates the biomass yield, nutrient uptake and accumulation of secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* under saline conditions. *Ind Crops Prod*, 145, 112102.
- Moqsud, M.A., Hannan, M.A. & Omine, K. (2015). Assessment of factors influencing bioelectricity generation in paddy plant microbial cells. *Global Adv Res J Agric Sci*, 4(12), 840–850.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 33, 197.
- Papazoglou, E.G. (2007). *Arundo donax* L. stress tolerance under irrigation with heavy metal aqueous solutions. *Desalination*, 211, 304–313.
- Rikmann, E., Zekker, I., Tenno, T., Saluste, A. & Tenno T. (2018). Inoculum-free start-up of biofilm- and sludge-based deammonification systems in pilot scale. *Int J Environ Sci Technol*, 15, 133–148.
- Rusyn, I. (2021). Role of microbial community and plant species in performance of plant microbial fuel cells. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 152, 111697.
- Sathish-Kumar, K., Rivera, A.E., Murugesan, S., García-Mena, J., Maya, O., Frausto-Reyes, C. et al., 2019. Electricity generation from Nopal biogas effluent using a surface modified clay cup (cantarito) microbial fuel cell. *Heliyon*. 5, e01506.
- Sharma, A., & Chhabra, M. (2021). Performance evaluation of a photosynthetic microbial fuel cell (PMFC) using *Chlamydomonas reinhardtii* at cathode. *Bioresour Technol*, 338, 125499.

- Shi, Y., Pan, Y., Xiang, L., Zhu, Z., Fu, W., Hao, G., Geng, Z., Chen, S., Li, Y., & Han, D. (2022). Assembly of rhizosphere microbial communities in *Artemisia annua*: recruitment of plant growth-promoting microorganisms and inter-kingdom interactions between bacteria and fungi. *Plant Soil* 470, 127–139.
- Singh, A., & Kaushik, A. (2021). Removal of Cd and Ni with enhanced energy generation using biocathode microbial fuel cell: Insights from molecular characterization of biofilm communities. *J. Clean. Prod*, 315, 127940.
- Spencer, D.F., Liow, P.S., Chan, W.K., Ksander, G.G. & Getsinger, K.D. (2006). Estimating *Arundo donax* shoot biomass. *Aquat Bot*, 84, 272–276.
- Strik, D.P.B.T.B., Hamelers, H.V.M., Snel, J.F.H. & Buisman, C.J.N. (2008). Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int J Energy Res*, 32, 870–876.
- Sudirjo, E., Buisman, C.J.N. & Strik, D.P.B.T.B. (2019). Activated Carbon Mixed with Marine Sediment is Suitable as Bioanode Material for *Spartina anglica* Sediment/Plant Microbial Fuel Cell: Plant Growth, Electricity Generation, and Spatial Microbial Community Diversity. *Water*, 11(9), 1810.
- Swales, A., MacDonald, I.T. & Green, M.O. (2004). Influence of wave and sediment dynamics on cordgrass (*Spartina anglica*) growth and sediment accumulation on an exposed intertidal flat. *Estuaries*, 27, 225–243.
- Tapia, N.F., Rojas, C., Bonilla, C.A. & Vargas, I.T. (2017). Evaluation of *Sedum* as driver for plant microbial fuel cells in a semi-arid green roof ecosystem. *Ecol Eng*, 108, 203–210.
- Taşkan, B. (2020). Increased power generation from a new sandwich-type microbial fuel cell (ST-MFC) with a membrane-aerated cathode. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105781.
- Tongphanpharn, N., Chou, C.-H., Guan, C.-Y., & Yu, C.-P. (2021). Plant microbial fuel cells with *Oryza rufipogon* and *Typha orientalis* for remediation of cadmium contaminated soil. *Environ. Technol. Innov*, 24, 102030.

- Wetser, K., Dieleman, K., Buisman, C. & Strik, D. (2017). Electricity from wetlands: Tubular plant microbial fuels with silicone gas-diffusion biocathodes. *Appl. Energy*, 185, 642–649.
- Yaqoob, A.A., Mohamad Ibrahim, M.N., Umar, K., Bhawani, S.A., Khan, A., Asiri, A.M. & AlAmmari, A.M. (2021). Cellulose Derived Graphene/Polyaniline Nanocomposite Anode for Energy Generation and Bioremediation of Toxic Metals via Benthic Microbial Fuel Cells. *Polymers*, 13, 135.
- Zekker, I., Artemchuk, O., Rikmann, E., Ohimai, K., Dhar Bhowmick, G., Ghangrekar, M., et al. (2021b). Start-Up of Anammox SBR from Non-Specific Inoculum and Process Acceleration Methods by Hydrazine. *Water*, 13(3), 350.
- Zekker, I., Raudkivi, M., Artemchuk, O., Rikmann, E., Priks, H., Jaagura M., et al. (2021a). Mainstream-sidestream wastewater switching promotes anammox nitrogen removal rate in organic-rich, low-temperature streams. *Environ Technol*, 42(19), 3073–3082.
- Zhang, J., Cao, X., Wang, H., Long, X., & Li, X. (2020). Simultaneous enhancement of heavy metal removal and electricity generation in soil microbial fuel cell. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 192, 110314.

CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CONSORCIO MICROBIANO ADHERIDO AL ÁNODO DE UN SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO

5.1. Introducción

Un sistema bioelectroquímico como P-MFC es una tecnología innovadora que aplicada al ambiente genera bioelectricidad renovable (Strik *et al.*, 2008; Sudirjo *et al.*, 2019; Kuleshova *et al.*, 2021; Rusyn *et al.*, 2021; Apollon *et al.*, 2020; 2022a; 2022b). El método de las P-MFC consiste en insertar en un sustrato orgánico o inorgánico electrodos en un sistema de cultivo de diversas especies vegetales con la finalidad de generar bioelectricidad a través de la actividad de las EAB (Strik *et al.*, 2011; Arulmani *et al.*, 2021); según lo revisado por Sathish-Kumar *et al.* (2017), Maddalwar *et al.* (2021), Rusyn (2021), Apollon *et al.* (2022c). Lo anterior es el resultado del consumo de los productos de la fotosíntesis excretados a través de las raíces y también de la alimentación por los productos de descomposición de las plantas y los compuestos del sustrato (De Schamphelaire *et al.*, 2010; Shaikh *et al.*, 2021). En el compartimento anódico las EAB oxidan la materia orgánica (MO) proveniente de las aguas residuales, así como de la MO en el suelo, esta oxidación genera; dióxido de carbono (CO₂), protones y electrones (Xu *et al.*, 2017a). Los electrones recolectados por el ánodo migran a través de un circuito

externo hacia el compartimiento del electrodo catódico; y los protones llegan al cátodo a través de una membrana de intercambio protónico (PEM, por sus siglas en inglés) asociándose con el oxígeno (O₂) para formar la molécula de agua (Logan *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2017b).

Por otro lado, el compartimiento anódico es el principal lugar de crecimiento de los microorganismos. Es decir, es donde los microorganismos realizan sus principales actividades para la producción de bioelectricidad. Las EAB juegan un papel crucial en el rendimiento de los sistemas de P-MFC. En un artículo de revisión de Rusyn (2021), las EAB fueron presentadas como una de las principales responsables de la producción de electricidad con P-MFC. En este artículo de revisión, el autor presentó un panorama sobre las diferentes especies de microorganismos electroactivos (como eucariotas, patógenos, exoelectrógenos, etc.) que se encuentren generalmente en el compartimiento anódico. El rendimiento de una P-MFC depende de los tipos de EAB que actúan en la superficie del ánodo durante el tiempo de su operación (Wilberforce *et al.*, 2021).

Estudios previos han revelado alta presencia de bacterias de la familia *Micrococcaceae* en biopelículas anódicas de *S. hybridum* P-MFC (Tapia *et al.*, 2017). Además, bacterias como *Rhodobacter gluconicum*, *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp. Y *Geobacter* sp. Han sido reportadas en el ánodo de sistemas BES (Apollon *et al.*, 2021; Mier *et al.*, 2021). Otros tipos de bacterias de como *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y *Proteobacteria* han sido ampliamente encontradas previamente en otros estudios (Lauber *et al.*, 2009; Fierer *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las comunidades de EAB a través de sus vías respiratorias maximizan la eficiencia de energía y al mismo tiempo minimizan las

pérdidas potenciales extracelulares (Finkelstein *et al.*, 2006). Cuando la actividad y el crecimiento de EAB son regulados, la producción de energía se incrementa considerablemente (Aelterman *et al.*, 2008). Las P-MFC usadas en este estudio fueron inoculadas con orina de diferentes animales domésticos. Esto, permitió un crecimiento acelerado de EAB en el compartimento anódico del sistema.

Por lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la comunidad microbiana presente en el ánodo de cuatro P-MFC. Además, la generación de bioelectricidad también fue evaluada en este experimento. Finalmente, se destacó la relación rendimiento de bioelectricidad y diversidad bacteriana en el ánodo de las P-MFC.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Construcción y operación de las P-MFC

Las P-MFC fueron construidas usando macetas de arcilla en forma cilíndrica (3 mm de espesor); altura 20 cm y diámetro 9 cm (0.0693 m²). Se utilizaron 648 cm² de fieltro de grafito (6 mm de espesor) como cámara anódica (colocada sobre la superficie del cantarito) y 270 cm² de malla de acero inoxidable (PLACA 9.5 mm 610 X 610 mm) (colocada dentro de la maceta de arcilla) como cámara catódica. El ánodo fue colocado cerca de las raíces de la planta a una profundidad de 20 cm. Posteriormente, dentro de la maceta de arcilla se adicionó la orina, que sirvió de inóculo en la cámara catódica además de aportar nutrimentos esenciales para las plantas.

El experimento se llevó a cabo en campo abierto en el municipio de General Escobedo, N.L., México; se evaluaron cuatro P-MFC, bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones; de un total de 20 P-MFC. La unidad experimental fue una maceta de 7.25 L + una P-MFC instalada, la cual fue llenada con un sustrato orgánico proveniente de un vivero de Atlacomulco, ciudad de México. Para el material vegetal, se usaron plantas de *Stevia rebaudiana* (seis meses; altura de 40 cm) provenientes del mismo vivero. Los tratamientos evaluados fueron: (a) P-MFC-1* (testigo sin inocular), (b) P-MFC-2 + orina de bovino, (c) P-MFC-3 + orina de caprino y (d) P-MFC-4 + orina de ovino. Previa a la inoculación, las P-MFC fueron operadas durante 15 días. En este periodo se procedió a la irrigación de las plantas con 2 L de agua doméstica cada 2 días. Posteriormente, las P-MFC fueron inoculadas con una dosis de 642.86 mL de las orinas. Cabe mencionar que las P-MFC habían sido usadas en estudios previos evaluando la generación de bioelectricidad a largo plazo y el crecimiento de la planta (Apollon *et al.*, 2022b; artículo en consideración para su publicación).

5.2.2. Mediciones de bioelectricidad

El voltaje de circuito abierto fue monitoreado y realizado cada día a las 9 am durante 30 días con un multímetro digital (marca BSTEREN, modelo MUL-282, China). Posteriormente, se realizó la curva polarización aplicando manualmente 11 resistencias externas (en el rango de 100 Ω y 20 K Ω) cada 10 min desde la OCV. De acuerdo con los resultados de las curvas de polarización, los cables de ánodo y cátodo se conectaron utilizando una resistencia de 1000 Ω . El CCV se monitoreó en un intervalo de tiempo de 15 min/dato mediante el empleo de un sistema de adquisición automática basado en un

microcontrolador (Arduino, Modelo 2560 Mega) conectado a una computadora personal durante 30 días. La corriente y la potencia se calcularon utilizando la Ley de Ohm, como se informó en estudio previo (Apollon *et al.*, 2022a). Luego, las densidades de corriente y potencia se normalizaron considerando el área (0.0693 m^2) de la superficie del ánodo del reactor P-MFC.

5.2.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN y su secuenciación se realizó considerando los siguientes criterios: Se seleccionaron las P-MFC con mejor rendimiento de generación de energía (Figura 5.1) y el testigo que presentó el rendimiento más bajo (Tapia *et al.*, 2017; Timmers *et al.*, 2012).

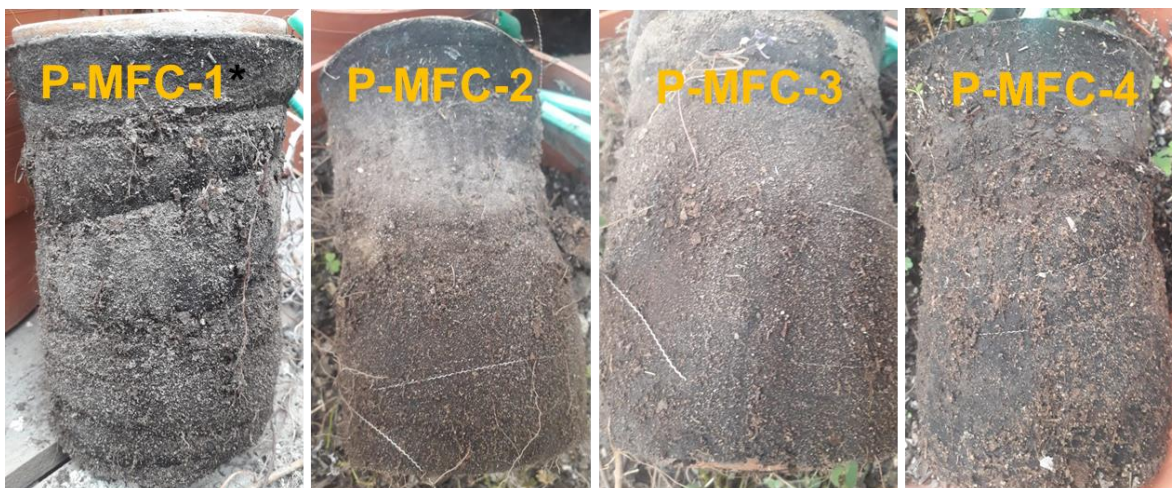


Figura 5.1. Muestras de P-MFC.

Para realizar la extracción se prepararon tres medios de cultivos (Agar nutritivo, Actino y PDA) para el crecimiento de las bacterias. De cada muestra, se pesó 0.5 g (fieltro de grafito), se transfirieron 10 mL de solución salina isotónica estéril (NaCl al 0.85 %) en un

matraz de aforación de 50mL, y se agitó durante 60 min. Posteriormente, en cinco Tubos Falcón de 15 mL (conteniendo 9 mL de la solución salina cada uno), se agregó 1 mL de la solución al Tubo 1 (dilución 1), de este se transfirió un 1 mL de la dilución 1 al Tubo 2 (dilución 2) y así sucesivamente hasta la dilución 5. Se eligieron las diluciones 3, 4 y 5 y se transfirieron 500 µL del material a Cajas Petri, se distribuyeron en forma triangular (con 2 repeticiones); se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 24 h. Posteriormente, se contaron las colonias presentes en cada medio; se eligieron las que fueron diferentes y se aislaron en estría cruzada para obtener cepas puras.

Se realizaron Tinciones de Gram a las cepas puras obtenidas de cada medio (Kit Gram HYCEL, México). Se efectuó un frotis por cepa en laminilla, luego se observaron las bacterias mediante microscopio electrónico (Marca: ZEISS, modelo Primo Star 1).

Previamente a la extracción de ADN, se sembraron las bacterias en Tubos Falcon de 15 mL que contenían 5 mL de caldo nutritivo por un tiempo de 12-24 h. Luego, se prepararon 40 mL de solución lisis (Triton X-100 a 2 %, Dodecil sulfato de sodio [$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$] a 1 %, NaCl a 100 mM y Tris-HCl pH 8.0). Se centrifugaron 2 mL de bacteria a 7000 rpm durante 3 min, el sobrenadante se descartó y se agregaron 400 µL de solución lisis más 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL); se agitó con vortex, y se incubó a una temperatura de 65 °C por 30 min. Posteriormente se agregaron 400 µL de fenol y se mezcló con vortex. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 mL al cual se le agregaron 2 µL de Rnasa (10 mg/mL); se incubó por un periodo de 30 min a 37 °C. Se llevó a volumen con cloroformo, se mezcló con vortex y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 200

μL de acetato de amonio al 7.5 M más un volumen de 2-propanol, se colocó al revés el tubo con la finalidad de observar la hebra de ADN. Se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se retiró el alcohol y se lavó la pastilla con 500 μL de etanol al 70 % (se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min). La pastilla se secó en un concentrador de ADN y luego se resuspendió en 30 μL de agua bidestilada hasta homogenizarla por completo. Para la electroforesis, se preparó el gel de agarosa a 1 % (p/v), se añadieron 0.3 g de agarosa y 3 μL de bromuro de etidio en 30 mL de buffer SB 1X. Se tomaron 3 μL por muestra y se mezclaron con 2 μL de Orange 6X, depositando en cada hueco.

Para la determinación de PCR se utilizó 16S rARN con los oligonucleótidos F (5'–AGAGTTTGATCCTGGCATG-3') y R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Se preparó una solución mix (Master mix) y cada 25 μL contenía: 2.5 μL del buffer al 10x; 0.5 μL de dNTP's al 10 mM; 2.0 μL de Oligo (1.0 μL de Oligo F al 10 μM y 1.0 μL de Oligo R al 10 μM); 18.4 μL de agua bidestilada, 0.6 μL de Dream Taq Polimerasa (5 U/ μL) (Kit Invitrogen™ y Applied Biosystem™) y finalmente se extrajeron 2.0 μL de ADN genómico. Las reacciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (SelectCycler), el cual se programó para incluir las siguientes etapas: 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, y una etapa final de extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). Para determinar el peso molecular de los productos se utilizó un marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Suárez-González *et al.*, 2014). En el apéndice 3 se encuentra un

ejemplo del proceso de extracción de ADN de los consorcios microbianos en este estudio.

5.2.4. Análisis estadístico

De los datos de bioelectricidad obtenidos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y Prueba Tukey ($p < 0.05$) para la comparación de medias, utilizando el Software Minitab 19. La diversidad bacteriana se determinó a través de tinción gram y a través de microscopio viendo la forma que tiene cada cepa.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Rendimiento de bioelectricidad

La P-MRC-2 mostró mayor rendimiento de generación de bioelectricidad a largo plazo alcanzando una densidad de potencia máxima de 43.68 mW m^{-2} a los dos días del arranque del sistema. Este valor fue constante casi todo el periodo de funcionamiento del sistema (véase la Figura 4.5a de la sección 4.3.2). En estudio anterior, el mismo fenómeno fue observado en P-MFC basada en *Spartina anglica* (Sudirjo *et al.*, 2019). Además, las P-MFC-1* y P-MFC-3 fueron los reactores con mayor producción de bioelectricidad (6.28 mW m^{-2} y 6.09 mW m^{-2} , respectivamente); seguidas por la P-MFC-4 logrando un valor de 4.85 mW m^{-2} . Sin embargo, el control mostro la densidad de potencia más baja (3.46 mW m^{-2}) en este experimento. Para ver el comportamiento de generación de bioelectricidad, los lectores pueden ver la Figura 4.5 de la sección 4.3.2.

Por otra parte, Sudirjo *et al.* (2019) lograron una densidad de potencia de 1.04 mW m^{-2} en P-MFC embebida con *Spartina anglica*. La P-MFC estuvo operando con carbón activado + un sustrato (sedimentos marinos) como compartimento anódico. La densidad de potencia lograda en la P-MFC-2 (en este experimento) fue 42 veces mayor en comparación con el rendimiento logrado en la P-MFC basada en *Spartina anglica*. Lo anterior indica que los sistemas bioelectroquímicos embebidos con *Stevia rebaudiana* tienen un gran potencial para producir bioelectricidad con respecto a otras especies de plantas incluyendo *Spartina anglica*. Además, el rendimiento de un sistema bioelectroquímico basado en planta depende de factores como la actividad de los microorganismos en la superficie del ánodo (Harshitha *et al.*, 2019), la consistencia de las biopelículas en el ánodo (Hassan *et al.*, 2019) y la oxidación de la MO durante el proceso.

5.3.2. Análisis de población bacteriana en la superficie del ánodo

Los resultados del aislamiento de bacterias mostraron mayor número de colonias en la superficie del ánodo de los reactores P-MFC-4 (inoculada con orina de oveja) y P-MFC-3 (inoculada con orina de cabra), respectivamente. Mientras en la P-MFC-1* (control, sin inocular) se observó menor cantidad de colonias en este estudio. Las Figuras 5.2a, 5.2b, 5.2c y 5.2d muestran las bacterias adheridas al ánodo de los reactores P-MFC-1*, P-MFC-2, P-MFC-3 y P-MFC-4, respectivamente. Todas estas cepas fueron aisladas usando como medio de cultivo Agar nutritivo, el cual permitió determinar solamente las bacterias. Además, los resultados de las tinciones Gram presentaron una similitud entre

las muestras analizadas respecto a los tipos de bacterias encontradas en este estudio. Las bacterias de forma *Bacilos* fueron las más abundantes en la superficie del ánodo de todos los reactores evaluados. Los resultados de las Tinciones Gram indicaron que la mayoría de las bacterias son Gram positivas. En la P-MFC-4, se encontraron bacterias de tipo *Actinobacteria* usando como medio de cultivo ISP2 (Figura 5.3a, 5.3b).

La Figura 5.4a muestra los fragmentos de ADN de las diferentes cepas aisladas. Se puede observar que hay un grado de similitud entre cada cepa. Esto explica la gran diversidad de las bacterias de tipo *Bacilos* en el ánodo de las P-MFC. En la Figura 5.4a, se observa que los fragmentos de ADN amplificados en la superficie del ánodo de los cuatro reactores indicaron 600 pb (pares de base) del gen 16S rARN. Esto significa que los fragmentos recibieron suficiente información filogénica para las secuencias. Por lo tanto, no se apreciaron diferencias entre los fragmentos analizados. Una vez obteniendo la ampliación de los fragmentos de ADN, estos fueron reamplificados (Figura 5.4b) para estar seguro de que el ADN este presente. La reamplificación indicó que todos los fragmentos de ADN corrieron de la misma forma (600 pb).

Por otro lado, se aislaron un total de 79 cepas, de las cuales 17 fueron encontradas en P-MFC-1* (2 en ISP2 y 15 en AN), 9 en P-MFC-2 (1 en ISP2 y 8 en AN), 18 en P-MFC-3 (2 en ISP2 y 16 en AN) y 35 en P-MFC-4 (23 en ISP2 y 12 en AN). Mayor número de cepas fue encontrado en la P-MFC-4 (44.30 %), seguida por la P-MFC-3 (22.78 %), P-MFC-*1 (21.51 %) y P-MFC-2 (11.39 %), respectivamente.

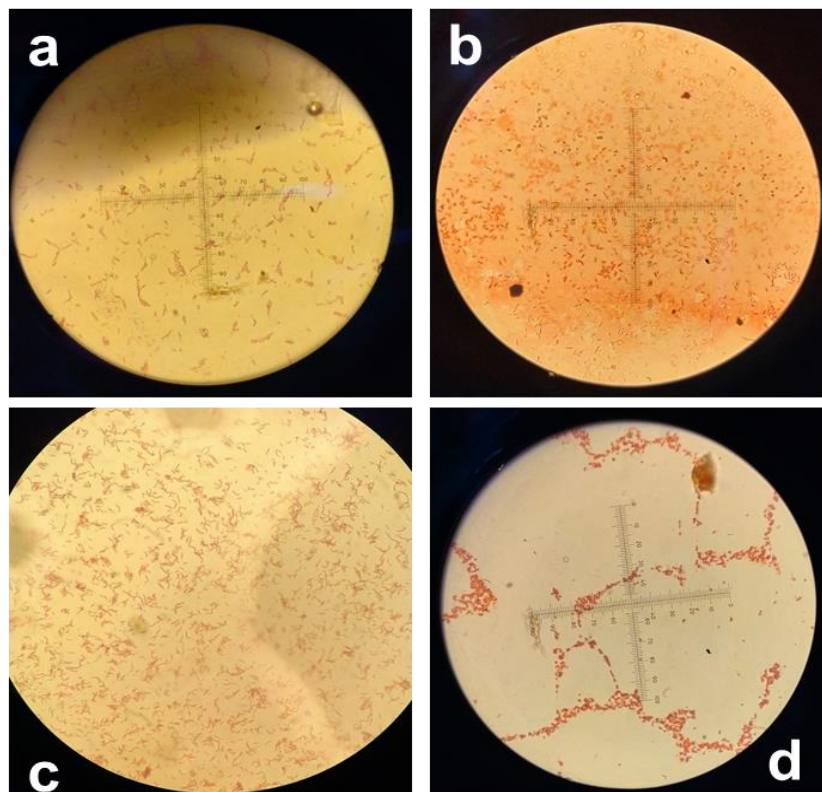


Figura 5.2. Bacterias encontradas en la superficie del ánodo de (a) P-MFC-1*, (b) P-MFC-2, (c) P-MFC-3 y (d) P-MFC-4. Medio de cultivo: agar nutritivo (AN).

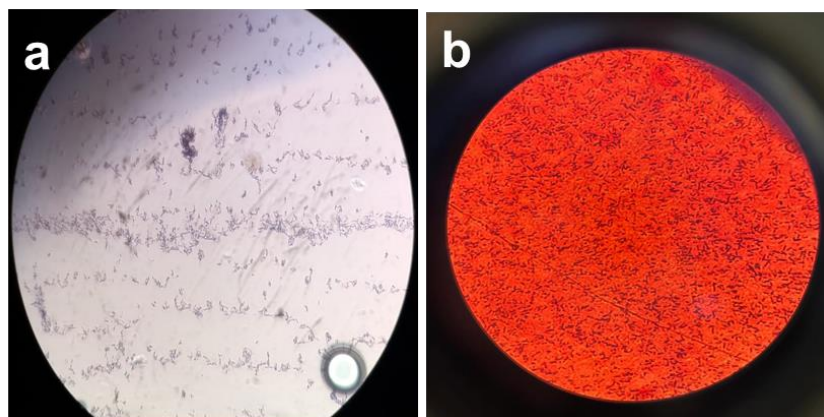


Figura 5.3. Bacterias (a) Gram positivas y (b) Gram Negativas encontradas en P-MFC-4. Medio de cultivo: ISP2.

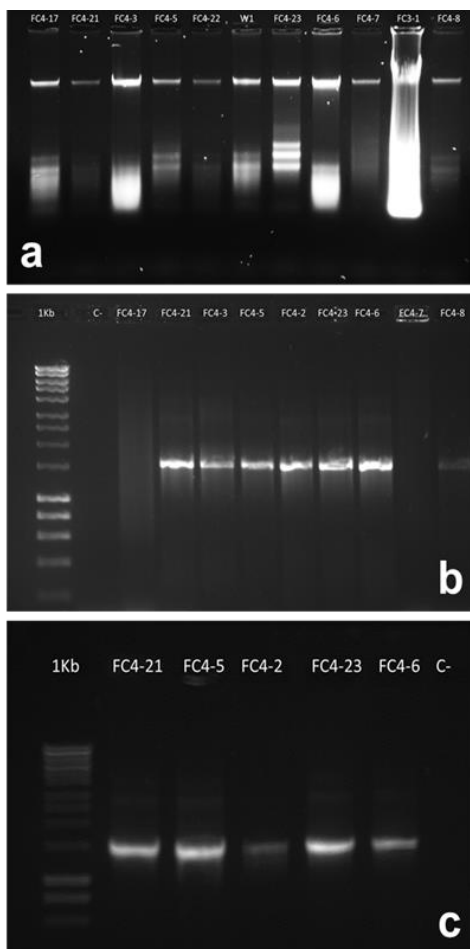


Figura 5.4. (a) extracción de ADN, (b) PCR y (c) Reamplificación de ADN de las bacterias encontradas en el ánodo de los reactores P-MFC.

5.4. Conclusiones

Como se puede observar, en este estudio se utilizaron P-MFC integradas con *Stevia rebaudiana* para la caracterización del consorcio microbiano presente en la superficie del ánodo de diferentes P-MFC. Los resultados indicaron que, en término de producción de bioelectricidad, la P-MFC inoculado con orina de bovino fue el mejor reactor, alcanzando una densidad de potencia de 43.68 mW m^{-2} . Mientras que mayor actividad bacteriana (44.30%) fue observada en la P-MFC inoculada con orina de oveja. En este experimento,

la actividad bacteriana no influyó en el rendimiento de bioelectricidad en comparación con estudios previos. Sin embargo, la aplicación de la orina fue un factor crucial para aumentar la eficiencia del sistema.

Referencias

Apollon, W., Kamaraj, S. K., Silos-Espino, H., Perales-Segovia, C., Valera-Montero, L. L., Maldonado-Ruelas, V. A. et al. (2020). Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: Demonstration of their applications. *Appl Energy*, 279, 115788.

Apollon, W., Valera-Montero, L. L., Perales-Segovia, C., Maldonado-Ruelas, V. A., Ortiz-Medina, R. A., Gómez-Leyva, J. F. et al. (2022a). Effect of ammonium nitrate on novel cactus pear genotypes aided by biobattery in a semi-arid ecosystem. *Sustain. Energy Technol. Assess*, 49, 101730.

Apollon, W., Luna-Maldonado, A.I., Kamaraj, S.-K., Vidales-Contreras, J.A., Rodríguez-Fuentes, H., Gómez-Leyva, J.F. et al. (2022b). Self-Sustainable Nutrients Reutilization Associated to Electricity Generation from Plant Microbial Fuel Cells. SETA-D-22-00449, Available at SSRN:

Apollon, W., Rusyn, I., González-Gamboa, N., Kuleshova, T., Luna-Maldonado, A. I., Vidales-Contreras, J. A. et al. (2022c). Improvement of zero waste sustainable recovery using microbial energy generation systems: A comprehensive review. *Sci. Total Environ*, 817, 153055.

Arulmani, S. R. B., Gnanamuthu, H. L., Kandasamy, S., Govindarajan, G., Alsehli, M., Elfasakhany, A., ... Zhang, H. (2021). Sustainable bioelectricity production from

Amaranthus viridis and *Triticum aestivum* mediated plant microbial fuel cells with efficient electrogenic bacteria selections. *Process Biochem*, 107, 27–37.

Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., & Rabaey, K. (2008). The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 78(3), 409–418.

Chiranjeevi, P., Mohanakrishna, G., Mohan, S.V., 2012. Rhizosphere mediated electrogenesis with the function of anode placement for harnessing bioenergy through CO₂ sequestration. *Bioresour. Technol*. 124, 364–370.

De Schamphelaire, L., Cabezas, A., Marzorati, M., Friedrich, M.W., Boon, N., Verstraete, W., 2010. Microbial community analysis of anodes from sediment microbial fuel cells powered by rhizodeposits of living rice plants. *Appl. Environ. Microbiol*. 76, 2002–2008.

Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L., Owens, S., Gilbert, J. A., Wall, D. H., & Caporaso, J. G. (2012). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *PNAS USA*, 109(52), 21390-21395.

Finkelstein, D. A., Tender, L. M., & Zeikus, J. G. (2006). Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota. *Environ. Sci. Technol*, 40(22), 6990–6995.

- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harshitha, G., Sahoo, A. & Sethy, R. (2019). Bioelectricity generation from different biomass feed at anode chamber and to study process parameters in microbial fuel cells. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 20, 101191.
- Hassan, S.H., Zohri, A.E.N.A. & Kassim, R.M. (2019). Electricity generation from sugarcane molasses using microbial fuel cell technologies. *Energy*, 178, 538–543.
- Kuleshova, T. E., Gall', N. R., Galushko, A. S., & Panova, G. G. (2021). Electrogenesis in plant–microbial fuel cells in parallel and series Connections. *Tech. Phys.* 66, 496–504.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol*, 75(15), 5111–5120.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S. et al. (2006). *Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology*†. *Environ. Sci. Technol.* 40(17), 5181–5192.
- Maddalwar, S., Kumar Nayak, K., Kumar, M., & Singh, L. (2021). Plant microbial fuel cell: Opportunities, challenges, and prospects. *Bioresour Technol*, 341, 125772.

- Rusyn, I.B., Medvediev, O.V. & Valko, B.T. (2021). Enhancement of bioelectric parameters of multi-electrode plant–microbial fuel cells by combining of serial and parallel connection. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **18**, 1323–1334.
- Rusyn, I. (2021). Role of microbial community and plant species in performance of plant microbial fuel cells. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 152, 111697.
- Sathish-Kumar K., Vignesh V., Caballero-Briones F. 2017. Sustainable Power Production from Plant-Mediated Microbial Fuel Cells. In: Dhanarajan A. (eds) *Sustainable Agriculture towards Food Security*. Springer, Singapore. Pp 85-107.
- Shaikh, R., Rizvi, A., Quraishi, M., Pandit, S., Mathuriya, A. S., Gupta, P. K et al. (2021). Bioelectricity production using plant-microbial fuel cell: Present state of art. *S. Afr. J. Bot.*, 140, 393–408.
- Strik, D.P., Snel, J.F., Buisman, C.J., 2008. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *Int. J. Energy Res.* 32, 870–876.
- Strik, D.P., Timmers, R.A., Helder, M., Steinbusch, K.J., Hamelers, H.V. & Buisman, C.J. (2011). Microbial solar cells : applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends Biotechnol.* 29, 41–49.

- Suárez-González, M. E., López, G. M., Délano-Frier, J. P. & Gómez-Leyva, J. F. (2014). Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Agave tequilana* and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a) biotic-stress related elicitors. *J. Plant Physiol*, 171, 359-372.
- Sudirjo, E., de Jager, P., Buisman, C.J.N. & Strik, P.B.T.B. (2019). Performance and Long-Distance Data Acquisition via LoRa Technology of a Tubular Plant Microbial Fuel Cell Located in a Paddy Field in West Kalimantan, Indonesia. *Sensors*, 19(21), 4647.
- Tapia, N.F., Claudia R., Carlos A.B. & Ignacio T.V. (2017). Evaluation of *Sedum* as driver for plant microbial fuel cells in a semi-arid green roof ecosystem. *Ecological Engineering*. 108, 203-210.
- Timmers, R.A., Rothballer, M., Strik, D.P., Engel, M., Schulz, S., Schloter, M., Hartmann, A., Hamelers, B., Buisman, C.J.N., 2012. Microbial community structure elucidates performance of *Glyceria maxima* plant microbial fuel cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 537–548.
- Wilberforce, T., Sayed, E. T., Abdelkareem, M. A., Elsaid, K., & Olabi, A. G. (2021). Value added products from wastewater using bioelectrochemical systems : Current trends and perspectives. *J. Water Process. Eng*, 39.

Xu, X., Zhao, Q., Wu, M., Ding, J., & Zhang, W. (2017a). Biodegradation of organic matter and anodic microbial communities analysis in sediment microbial fuel cells with/without Fe(III) oxide addition. *Bioresour Technol*, 225, 402–408.

Xu P, Xiao E-R, Xu D, Zhou Y, He F, Liu B-Y. et al. (2017b). Internal nitrogen removal from sediments by the hybrid system of microbial fuel cells and submerged aquatic plants. *PloS ONE* 12(2): e0172757.

APÉNDICES

Apéndice 1

1.1. Código del programa de adquisición de datos de voltaje de P-MFC con Arduino.

Adquisicion_2.01

```

double period=1000;
unsigned long time now=0;
int j=1;
int i=1;
float res=0;
const int hab_1 = 43;
const int hab_2 = 42;
const int hab_3 = 41;
const int hab_4 = 40;
const int sel_1 = 44;
const int sel_2 = 45;
const int sel_3 = 46;
const int interrup = 47;

void print_time (unsigned long time_millis);

// the setup routine runs once when you press reset:
void setup() {

// initialize serial communication at 900000 bits per second:
Serial.begin(9600);
pinMode(hab_1, OUTPUT);
pinMode(hab_2, OUTPUT);
pinMode(hab_3, OUTPUT);
pinMode(hab_4, OUTPUT);
pinMode(sel_1, OUTPUT);
pinMode(sel_2, OUTPUT);
pinMode(sel_3, OUTPUT);
pinMode(interrupt, INPUT);

}

void loop()

// the loop routine runs over and over again forever:
{
if (i==1)
{

```

```
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==2)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==3)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==4)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==5)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==6)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==7)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
```



```
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==8)
{
digitalWrite(hab_1, HIGH);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}

//THIS IS THE BEGINING OF SECOND CYCLE
if (i==9)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==10)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==11)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==12)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==13)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
```

```
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==14)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==15)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==16)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, HIGH);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
//THIS IS THE BEGINNING OF THE THIRD CYCLE

if (i==17)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==18)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==19)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
```

```

digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==20)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==21)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==22)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==23)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==24)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, HIGH);
digitalWrite(hab_4, LOW);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}

//THIS IS THE BEGINNING OF THE FOURTH CYCLE

if (i==29)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);

```

```
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==30)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==31)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==32)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, LOW);
}
if (i==25)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==27)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, LOW);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==26)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
```

```
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, LOW);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}
if (i==28)
{
digitalWrite(hab_1, LOW);
digitalWrite(hab_2, LOW);
digitalWrite(hab_3, LOW);
digitalWrite(hab_4, HIGH);
digitalWrite(sel_1, HIGH);
digitalWrite(sel_2, HIGH);
digitalWrite(sel_3, HIGH);
}

if (millis()>time_now + period)
{

// read the input on analog pin 0:
int sensorValue = analogRead(A0);

res=(sensorValue*0.00171204)-0.0072366;

// print out the value you read:

Serial.print(j);
Serial.print('\t');
Serial.print("C");
Serial.print(i);
Serial.print('\t');
Serial.print(res);
Serial.print('\t');

time_now=millis();

j=j+1;
i=i+1;

if (i>32)
{
i=1;
Serial.print('\n');
}
}
}
```

1.2. Programa processing usado para guardar automaticamente los datos de voltaje.

```

import processing.serial.*;
String val;
PrintWriter output;
Serial myPort;    // The serial port
int savedTime;

void setup () {
String portName = Serial.list()[0];
myPort = new Serial(this, portName, 9600); //
output=createWriter("Voltaje.txt");
// A serialEvent() is generated when a newline character is received :
myPort.bufferUntil('\n');
}
void draw () {
// everything happens in the serialEvent()
}

void serialEvent (Serial myPort) {
if ( myPort.available() > 0)
{ // If data is available,
val = myPort.readStringUntil('\n'); // read it and store it in val

if (val!=null)
{
println(val); //print it out in the console
output.print ( day()+"-"+month()+"-"+year()+"\t"+hour ()+"."+ minute ()+ "\t" + val ); //output.println( val );
output.flush();
//output.close();
}
}
}

//void keyPressed() {
//output.flush();
//output.close();
//exit();
//}

```

1.3. Monitoreo de datos por el programa de adquisición.

Voltaje - Notepad																												
File Edit Format View Help																												
19/11/2020	17:6	1	C1	0.74	2	C2	-0.01	3	C3	-0.00	4	C4	-0.01	5	C5	-0.00	6	C6	1.47	7	C7	0.21	8	C8	0.37	9	C9	0.48
19/11/2020	17:6	33	C1	0.70	34	C2	-0.01	35	C3	-0.01	36	C4	0.00	37	C5	-0.01	38	C6	-0.01	39	C7	0.22	40	C8	0.36	41	C9	0.48
19/11/2020	17:7	65	C1	0.70	66	C2	-0.00	67	C3	-0.00	68	C4	-0.01	69	C5	-0.01	70	C6	1.74	71	C7	0.21	72	C8	0.37	73	C9	0.34
19/11/2020	17:7	97	C1	0.72	98	C2	-0.00	99	C3	-0.00	100	C4	-0.01	101	C5	-0.00	102	C6	1.42	103	C7	0.21	104	C8	0.37	105	C9	0.48
19/11/2020	17:8	129	C1	0.72	130	C2	-0.01	131	C3	-0.01	132	C4	-0.01	133	C5	-0.01	134	C6	-0.01	135	C7	0.21	136	C8	0.35	137	C9	0.48
19/11/2020	17:8	161	C1	0.77	162	C2	-0.01	163	C3	-0.01	164	C4	-0.01	165	C5	-0.01	166	C6	1.74	167	C7	0.21	168	C8	0.37	169	C9	0.43
19/11/2020	17:9	193	C1	0.72	194	C2	-0.00	195	C3	0.01	196	C4	-0.01	197	C5	-0.01	198	C6	1.74	199	C7	0.21	200	C8	0.37	201	C9	0.46
19/11/2020	17:9	225	C1	0.78	226	C2	-0.00	227	C3	-0.01	228	C4	-0.01	229	C5	-0.01	230	C6	-0.01	231	C7	0.17	232	C8	0.34	233	C9	0.42
19/11/2020	17:10	257	C1	0.77	258	C2	-0.00	259	C3	-0.01	260	C4	-0.01	261	C5	-0.01	262	C6	1.65	263	C7	0.21	264	C8	0.39	265	C9	0.47
19/11/2020	17:10	289	C1	0.77	290	C2	-0.01	291	C3	0.00	292	C4	-0.00	293	C5	-0.00	294	C6	1.61	295	C7	0.21	296	C8	0.37	297	C9	0.47
19/11/2020	17:11	321	C1	0.71	322	C2	-0.01	323	C3	-0.01	324	C4	-0.01	325	C5	-0.01	326	C6	-0.01	327	C7	0.21	328	C8	0.37	329	C9	0.47
19/11/2020	17:12	353	C1	0.73	354	C2	-0.01	355	C3	-0.01	356	C4	-0.01	357	C5	-0.01	358	C6	-0.01	359	C7	0.21	360	C8	0.35	361	C9	0.48
19/11/2020	17:12	385	C1	0.71	386	C2	-0.00	387	C3	-0.01	388	C4	-0.01	389	C5	-0.00	390	C6	0.12	391	C7	0.21	392	C8	0.36	393	C9	0.47
19/11/2020	17:13	417	C1	0.69	418	C2	-0.01	419	C3	0.01	420	C4	-0.01	421	C5	-0.01	422	C6	-0.01	423	C7	0.21	424	C8	0.38	425	C9	0.44
19/11/2020	17:13	449	C1	0.70	450	C2	-0.01	451	C3	-0.01	452	C4	-0.01	453	C5	-0.01	454	C6	-0.01	455	C7	0.21	456	C8	0.35	457	C9	0.48
19/11/2020	17:14	481	C1	0.74	482	C2	-0.01	483	C3	0.00	484	C4	-0.01	485	C5	-0.01	486	C6	-0.01	487	C7	0.21	488	C8	0.35	489	C9	0.48
19/11/2020	17:14	513	C1	0.74	514	C2	-0.01	515	C3	0.02	516	C4	-0.01	517	C5	0.01	518	C6	1.74	519	C7	0.20	520	C8	0.36	521	C9	0.48
19/11/2020	17:15	545	C1	0.75	546	C2	-0.01	547	C3	-0.01	548	C4	-0.01	549	C5	-0.01	550	C6	0.81	551	C7	0.20	552	C8	0.37	553	C9	0.45
19/11/2020	17:15	577	C1	0.76	578	C2	-0.01	579	C3	-0.00	580	C4	-0.01	581	C5	-0.01	582	C6	0.70	583	C7	0.21	584	C8	0.35	585	C9	0.47
19/11/2020	17:16	609	C1	0.74	610	C2	-0.01	611	C3	0.02	612	C4	-0.00	613	C5	-0.01	614	C6	-0.01	615	C7	0.21	616	C8	0.35	617	C9	0.31
19/11/2020	17:16	641	C1	0.72	642	C2	-0.01	643	C3	-0.01	644	C4	-0.01	645	C5	0.00	646	C6	1.74	647	C7	0.21	648	C8	0.37	649	C9	0.47
19/11/2020	17:17	673	C1	0.71	674	C2	-0.01	675	C3	-0.01	676	C4	-0.01	677	C5	-0.01	678	C6	1.59	679	C7	0.21	680	C8	0.39	681	C9	0.47
19/11/2020	17:17	705	C1	0.72	706	C2	-0.01	707	C3	-0.01	708	C4	-0.01	709	C5	-0.01	710	C6	-0.01	711	C7	0.21	712	C8	0.35	713	C9	0.47
19/11/2020	17:18	737	C1	0.71	738	C2	-0.01	739	C3	-0.01	740	C4	-0.01	741	C5	-0.01	742	C6	-0.01	743	C7	0.21	744	C8	0.35	745	C9	0.37
19/11/2020	17:19	769	C1	0.76	770	C2	-0.01	771	C3	-0.01	772	C4	-0.01	773	C5	-0.01	774	C6	-0.01	775	C7	0.21	776	C8	0.35	777	C9	0.23
19/11/2020	17:19	801	C1	0.74	802	C2	-0.01	803	C3	0.00	804	C4	-0.01	805	C5	-0.01	806	C6	0.68	807	C7	0.21	808	C8	0.34	809	C9	0.46
19/11/2020	17:20	833	C1	0.76	834	C2	-0.01	835	C3	0.01	836	C4	-0.01	837	C5	-0.01	838	C6	1.52	839	C7	0.21	840	C8	0.39	841	C9	0.48
19/11/2020	17:20	865	C1	0.74	866	C2	-0.01	867	C3	-0.00	868	C4	-0.01	869	C5	-0.01	870	C6	-0.01	871	C7	0.21	872	C8	0.36	873	C9	0.48
19/11/2020	17:44	897	C1	0.69	898	C2	-0.01	899	C3	-0.01	900	C4	-0.00	901	C5	-0.01	902	C6	0.30	903	C7	0.21	904	C8	0.37	905	C9	0.48
19/11/2020	17:44	2305	C1	0.76	2306	C2	-0.01	2307	C3	-0.01	2308	C4	-0.01	2309	C5	-0.01	2310	C6	-0.01	2311	C7	0.21	2312	C8	0.38	2313	C9	0.48
19/11/2020	17:45	2337	C1	0.70	2338	C2	-0.01	2339	C3	-0.00	2340	C4	-0.01	2341	C5	-0.01	2342	C6	1.28	2343	C7	0.21	2344	C8	0.38	2345	C9	0.47
19/11/2020	17:45	2369	C1	0.78	2370	C2	-0.01	2371	C3	-0.01	2372	C4	-0.01	2373	C5	-0.01	2374	C6	0.09	2375	C7	0.21	2376	C8	0.37	2377	C9	0.29
19/11/2020	17:46	2401	C1	0.70	2402	C2	-0.00	2403	C3	-0.00	2404	C4	-0.01	2405	C5	-0.00	2406	C6	1.11	2407	C7	0.20	2408	C8	0.38	2409	C9	0.47
19/11/2020	17:46	2433	C1	0.65	2434	C2	-0.00	2435	C3	0.00	2436	C4	-0.01	2437	C5	-0.00	2438	C6	1.74	2439	C7	0.21	2440	C8	0.35	2441	C9	0.47
19/11/2020	17:47	2465	C1	0.71	2466	C2	-0.01	2467	C3	0.01	2468	C4	-0.01	2469	C5	0.01	2470	C6	1.72	2471	C7	0.21	2472	C8	0.37	2473	C9	0.41
19/11/2020	17:47	2497	C1	0.68	2498	C2	-0.01	2499	C3	0.00	2500	C4	-0.01	2501	C5	-0.01	2502	C6	0.86	2503	C7	0.21	2504	C8	0.36	2505	C9	0.36
19/11/2020	17:48	2529	C1	0.72	2530	C2	-0.01	2531	C3	-0.01	2532	C4	-0.01	2533	C5	-0.01	2534	C6	0.86	2535	C7	0.20	2536	C8	0.37	2537	C9	0.47
19/11/2020	17:48	2561	C1	0.75	2562	C2	-0.01	2563	C3	-0.01	2564	C4	-0.01	2565	C5	-0.01	2566	C6	1.73	2567	C7	0.21	2568	C8	0.37	2569	C9	0.67
19/11/2020	17:49	2593	C1	0.71	2594	C2	-0.01	2595	C3	0.00	2596	C4	-0.01	2597	C5	-0.01	2598	C6	-0.01	2599	C7	0.21	2600	C8	0.35	2601	C9	0.59
19/11/2020	17:49	2625	C1	0.69	2626	C2	-0.01	2627	C3	-0.01	2628	C4	-0.01	2629	C5	-0.01	2630	C6	-0.01	2631	C7	0.21	2632	C8	0.36	2633	C9	0.68
19/11/2020	17:50	2657	C1	0.67	2658	C2	-0.01	2659	C3	-0.01	2660	C4	-0.01	2661	C5	-0.00	2662	C6	1.60	2663	C7	0.21	2664	C8	0.37	2665	C9	0.68
19/11/2020	17:51	2689	C1	0.75	2690	C2	-0.01	2691	C3	-0.01	2692	C4	-0.01	2693	C5	-0.01	2694	C6	-0.01	2695	C7	0.21	2696	C8	0.35	2697	C9	0.69
19/11/2020	17:51	2721	C1	0.69	2722	C2	-0.01	2723	C3	-0.01	2724	C4	-0.00	2725	C5	-0.01	2726	C6	-0.01	2727	C7	0.21	2728	C8	0.36	2729	C9	0.69
19/11/2020	17:52	2753	C1	0.73	2754	C2	-0.01	2755	C3	-0.01	2756	C4	-0.01	2757	C5	-0.00	2758	C6	1.48	2759	C7	0.20	2760	C8	0.37	2761	C9	0.69
19/11/2020	17:52	2785	C1	0.69	2786	C2	-0.01	2787	C3	-0.01	2788	C4	-0.01	2789	C5	-0.01	2790	C6	-0.01	2791	C7	0.17	2792	C8	0.35	2793	C9	0.69
19/11/2020	17:53	2817	C1	0.70	2818	C2	-0.01	2819	C3	-0.01	2820	C4	-0.01	2821	C5	-0.01	2822	C6	1.23	2823	C7	0.21	2824	C8	0.37	2825	C9	0.68
19/11/2020	17:53	2849	C1	0.71	2850	C2	0.00	2851	C3	-0.01	2852	C4	-0.01	2853	C5	-0.01	2854	C6	-0.01	2855	C7	0.20	2856	C8	0.35	2857	C9	0.67
19/11/2020	17:54	2881	C1	0.65	2882	C2	-0.01	2883	C3	-0.01	2884	C4	-0.00	2885	C5	-0.01	2886	C6	-0.01	2887	C7	0.21	2888	C8	0.36	2889	C9	0.68
19/11/2020	17:54	2913	C1	0.71	2914	C2	-0.01	2915	C3	0.03	2916	C4	-0.01	2917	C5	-0.01	2918	C6	-0.01	2919	C7	0.21	2920	C8	0.34	2921	C9	0.69
19/11/2020	17:55	2945	C1	0.71	2946	C2	-0.01	2947	C3	-0.01	2948	C4	-0.01	2949	C5	-0.01	2950	C6	-0.01	2951	C7	0.21	2952	C8	0.36	2953	C9	0.69
19/11/2020	17:55	2977	C1	0.69	2978	C2	-0.00	2979	C3	-0.01	2980	C4	-0.01	2981	C5	-0.01	2982	C6	-0.01	2983	C7	0.21	2984	C8	0.3			

1.4. Código del programa de monitoreo de humedad del suelo con Arduino UNO.

```
int Humedad1 = A0;
int Humedad2= A1;
int row = 0;

void setup()
{
  Serial.begin(9600); // 9600 baud por segundo
  Serial.println ("CLEARDATA");
  Serial.println ("LABEL,Hora,Fecha,Humedad1, Humedad2");
}
void loop() {
int valorSensor = analogRead(A0);
valorSensor = constrain(valorSensor, 734.0469231, 897.230769);
//mapear los valores en porcentaje
Humedad1= map(valorSensor, 734.0469231, 897.230769, 100, 0);

Serial.print("DATA,TIME, DATE");
Serial.print(" , ");
Serial.println(Humedad1);

int valorSensor2 = analogRead(A1);
valorSensor2= constrain(valorSensor2, 734.0469231, 897.230769);
//mapear los valores en porcentaje
Humedad2 = map(valorSensor2, 734.0469231, 897.230769, 100, 0);

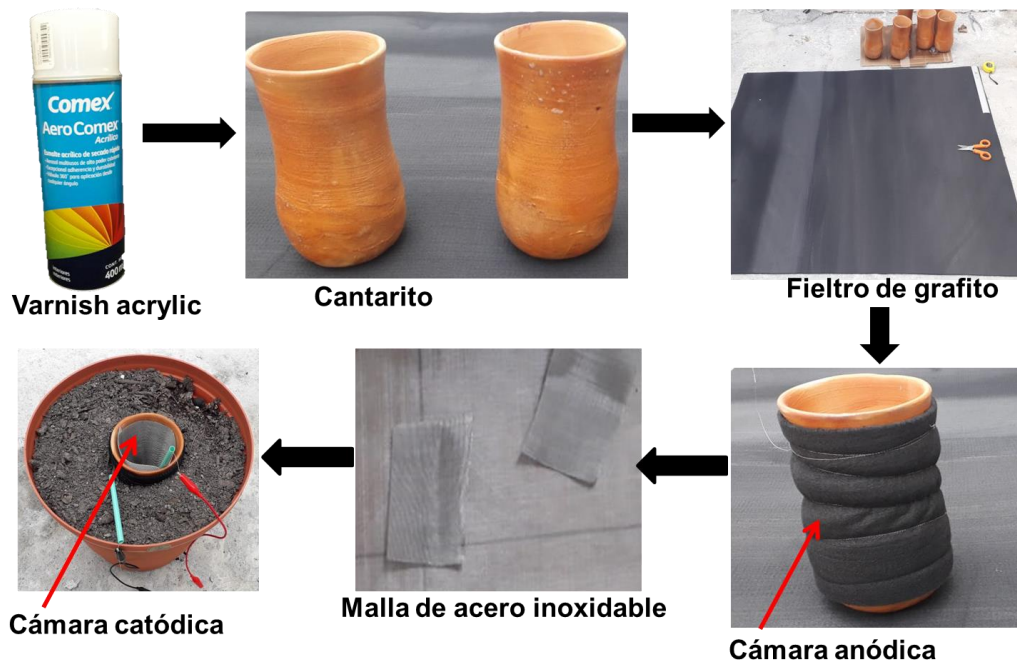
Serial.println(Humedad2);

delay(1000); // retardo de 15 min

}
```


Apéndice 2

2.1. Materiales de configuración de la P-MFC.



2.2. Electrodo sumergidos en agua previo a su instalación.



2.3. Establecimiento del experimento.



Llenado de macetas.



Trasplante e instalación de P-MFC.



Planta con buen desarrollo radicular.



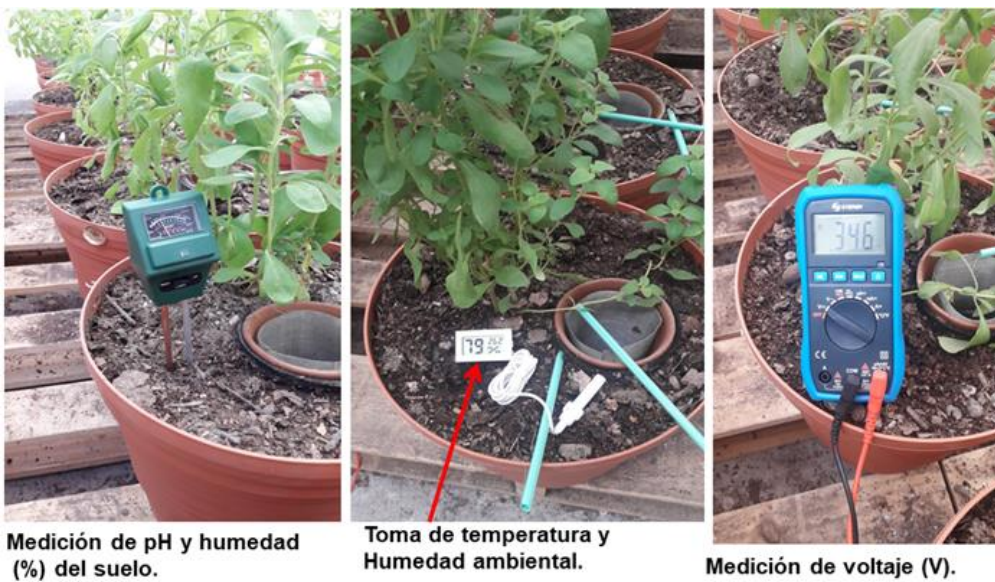
2.4. Experimento establecido.



2.5. Inoculación de las P-MFC.



2.6. Monitoreo de temperatura y de voltaje durante la operación de las P-MFC.

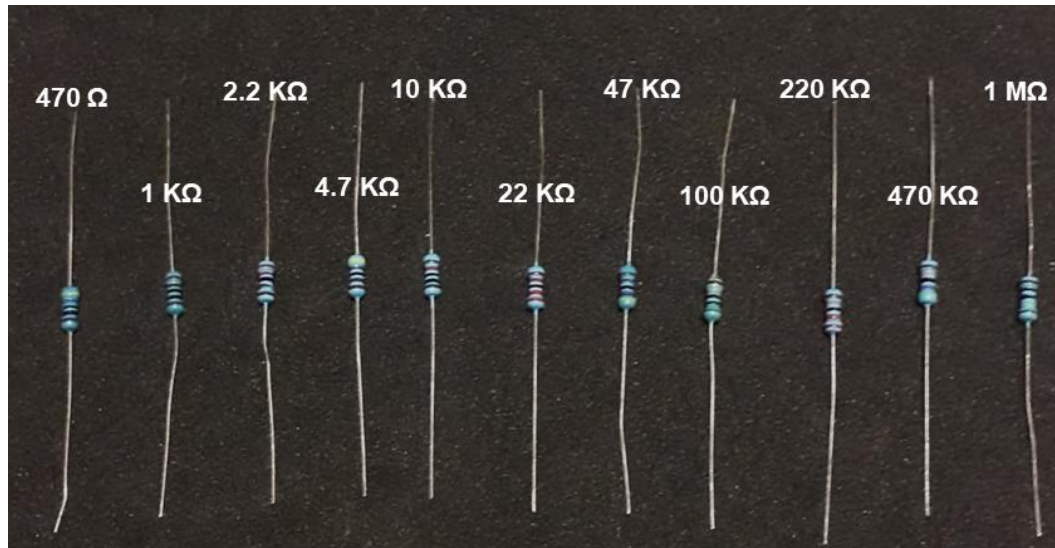


Medición de pH y humedad (%) del suelo.

Toma de temperatura y Humedad ambiental.

Medición de voltaje (V).

2.7. Resistores usados para la curva de polarización y circuito cerrado.



2.8. Conexión de las P-MFC en circuito cerrado.



2.8. Medición de pH y conductividad eléctrica de las orinas.



Medidores de pH y de CE.



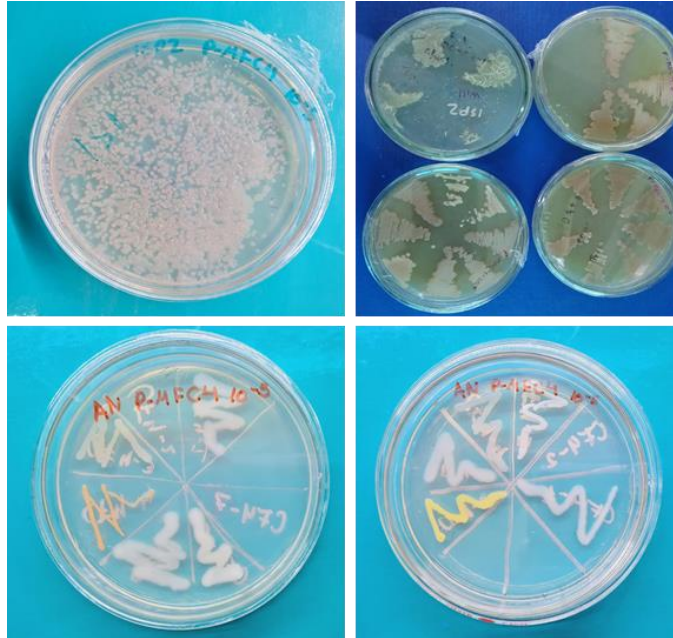
Medición del pH.



Medición de CE.

Apéndice 3

3.1. Aislamiento de los consorcios adheridos al ánodo de las P-MFC.



3.2. Electroforesis.



3.3. Vista de fragmentos de ADN.

